

Aus dem Institut für Virologie
Leiter: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Die Funktion der Coiled-Coil-Domäne im Nukleoprotein des Ebolavirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Katja Behrendt
aus Dortmund

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
30.10.2012

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Stephan Becker

Koreferent: Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

Für J. Gamböck,

H. Erbel

M. Laarmann

W. Kurz

und Frau Haase

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren	8
1.2	Klinik und Pathogenese des Ebolavirus.....	13
1.3	Diagnose, Therapie, Prävention	15
1.4	Morphologie des Ebolavirus.....	16
1.5	Genomstruktur des Ebolavirus.....	17
1.6	Die viralen Strukturproteine	18
1.7	Viraler Lebenszyklus.....	24
1.8	Der infektiöse VLP-Assay.....	27
1.9	Fragestellung.....	28
2.	Material	30
2.1	Chemikalien.....	30
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	32
2.3	Kits.....	33
2.4	Geräte.....	33
2.5	Puffer und Lösungen	35
2.5.1	Puffer	35
2.5.2	Lösungen.....	37
2.6	Wachstumsmedien	37
2.6.1	Wachstumsmedien für Bakterien	37
2.6.2	Wachstumsmedien für Säugerzellen	37
2.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	38
2.7.1	Nukleinsäuren als Größenmarker.....	38
2.7.2	Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide	38
2.7.3	DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen/ Mutagenesen)	39
2.8	Vektoren und rekombinante Plasmide	39
2.8.1	Vektoren	39
2.8.2	Rekombinante Plasmide.....	39
2.9	Proteine, Peptide und Aminosäuren.....	41
2.9.1	Enzyme	41
2.9.2	Antikörper und Affinitätsgele	41

2.9.3	Proteinmarker	42
2.10	Zellen.....	42
2.10.1	Prokaryotische Zellen	42
2.10.2	Eukaryotische Zellen.....	42
3.	Methoden.....	43
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.1.1	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Ketten	43
3.1.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren	45
3.1.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	45
3.1.3.1	Analytische DNA-Agarosegele.....	46
3.1.3.2	Präparative DNA-Agarosegele.....	46
3.1.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	46
3.1.5	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
3.1.6	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	48
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	48
3.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	49
3.1.9	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien	49
3.1.10	Präparation der Agarplatten	49
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (kleiner Maßstab).....	50
3.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (großer Maßstab).....	50
3.1.13	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	50
3.1.14	DNA- Sequenzierung.....	51
3.2	Zellbiologische Methoden.....	52
3.2.1	Kultivierung von HEK293- und HUH7- Zellen	52
3.2.2	Transiente DNA-Transfektion mit <i>TransIT</i>	52
3.2.3	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot	53
3.2.4	Untersuchung der Abbaukinetik von Proteinen mittels Cycloheximid	53
3.2.5	Infektiöser EBOV VLP-Assay.....	54
3.2.5.1	Aufreinigung der iVLPs	55
3.2.5.2	Proteinase K-Verdau der iVLPs	55
3.2.5.3	Nachweis der EBOV-spezifischen Transkription in Passage 0	56
3.2.5.4	Infektion von HUH7-Zellen in Passage 1.....	56
3.2.6	Aufreinigung von NP-Helices	57

3.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	57
3.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung	57
3.3.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.3.1.2	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	58
3.3.1.3	Antikörperfärbung des Western Blot und Detektion des Antikörpers	59
3.3.2	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	60
3.3.3	Indirekte Immunelektronenmikroskopie	61
3.3.4	Koimmunpräzipitation mit α -flag M2-Agarose	62
3.3.5	Fluorescence Complementation Assay	63
4.	Ergebnisse	65
4.1	Herstellung von Mutanten zur Untersuchung der Coiled-Coil- Domäne des NP.....	65
4.1.1	Stabilität der NP-Mutanten	66
4.2	Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne des NP für die Interaktion mit den Nukleokapsidproteinen.....	67
4.2.1	Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne auf die Interaktion des NP mit sich selbst	68
4.2.2	Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne des NP auf die Interaktion des NP mit VP30	69
4.2.3	Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne des NP auf die Interaktion des NP mit VP35	71
4.2.4	Untersuchungen der Interaktion zwischen den Nukleokapsidproteinen mittels Koimmunpräzipitation	72
4.3	Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne beim <i>self-assembly</i> von NP	73
4.3.1	Untersuchung der Selbst-Interaktion der Coiled-Coil-Domäne des NP im Complementation Assay	73
4.4	Die Bedeutung der NP-Coiled-Coil bei der Bildung von NP-Helices.....	78
4.5	Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne des NP für die virale Transkription	80
4.4.1	Einfluss der NP-Coiled-Coil-Domäne auf Transkription in Passage 0	81
4.4.2	Nachweis des Einbaus der NP-Mutanten in VLPs.....	83
4.4.3	Einfluss der NP- Coiled-Coil-Domäne auf Transkription in Passage 1	84
5.	Diskussion.....	87
6.	Zusammenfassung	98
7.	Summary	100
8.	Literaturverzeichnis.....	102
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	112

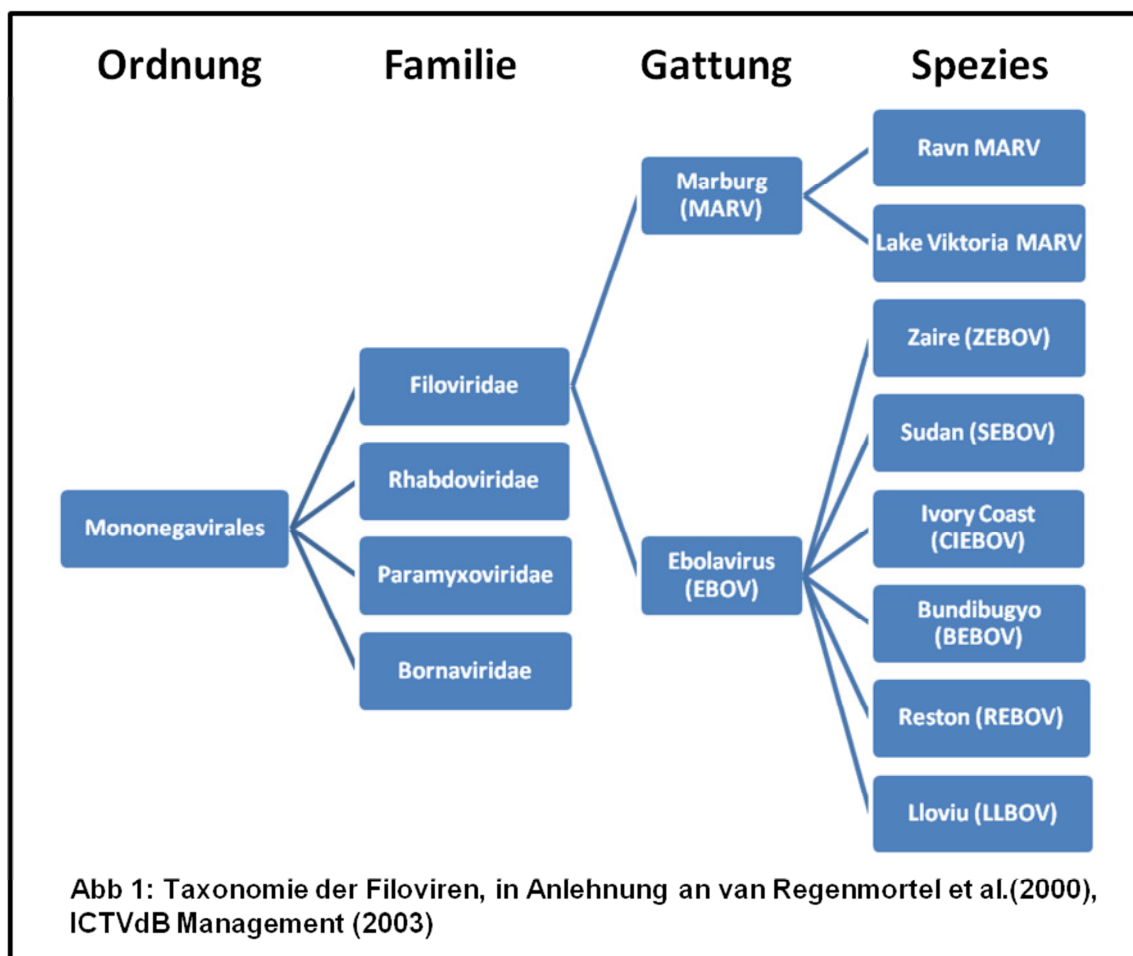
10.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	116
11.	Curriculum Vitae	117
12.	Liste der Akademischen Lehrer	118
13.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	119
14.	Danksagung.....	120

1. Einleitung

1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren

Das Ebolavirus (EBOV) bildet zusammen mit dem Marburgvirus (MARV) die Familie der Filoviridae. Diese verdanken ihren Namen der fadenförmigen Gestalt (lat filum=Faden) der Viruspartikel (Kiley, Bowen et al. 1982)

Aufgrund ihres negativ orientierten, einzelsträngigen und unsegmentierten RNA-Genoms werden Filoviren zusammen mit dem Rhabdoviren, Paramyxoviren und Bornaviren zur Ordnung der Mononegavirales zusammengefasst.



Mit Sequenzvergleichen konnte festgestellt werden, dass innerhalb der Ordnung der Mononegavirales die Paramyxoviren mit den Filoviren am nächsten verwandt sind (Muhlberger, Sanchez et al. 1992; Sanchez, Kiley et al. 1992).

Der Genus MARV wird durch eine einzige Spezies gebildet, während zum EBOV verschiedenen Spezies gehören: die humanpathogenen Zaire Ebolavirus (ZEBOV),

Sudan Ebolavirus (SEBOV), Bundibugyo Ebolavirus, das bisher nur in einem Fall festgestellte Ivory Coast Ebolavirus (CIEBOV) sowie das Reston Ebolavirus (REBOV), welches nicht human-pathogen ist (Johnson, Lange et al. 1977; Fisher-Hoch, Perez-Oronoz et al. 1992; Formenty, Boesch et al. 1999; Towner, Sealy et al. 2008). Die Genome der einzelnen Spezies divergieren um je 32-41% (Feldmann, Geisbert et al. 2005). Die humanpathogenen Filoviren verursachen ein hämorrhagisches Fieber mit fulminantem Verlauf, das je nach Spezies mit Letalitätsraten bis zu 90% einhergehen kann. Deshalb und weil es weder eine Impfung noch eine spezifische Behandlung gibt, werden Filoviren als Pathogene der biologischen Sicherheitsstufe L4 eingeteilt (Feldmann und Kiley 1999).

Erstmals bekannt wurden Filoviren 1967 als mehrere Menschen in Marburg, Frankfurt am Main und Belgrad nach dem Kontakt zu grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) aus Uganda Fieber entwickelten und schwer krank wurden. Insgesamt erkrankten 32 Personen von denen je sechs verstarben und sechs sekundär Infizierte einen eher milden Verlauf zeigten (Martini, Knauff et al. 1968; Slenczka 1999). Als Verursacher wurde ein Virus ausgemacht, das in Marburg zuerst isoliert und charakterisiert wurde, und deshalb nach der Stadt benannt wurde (Siegert, Shu et al. 1968). Nach einigen einzelnen Fällen in Zimbabwe/Südafrika 1975 und Kenia 1980/7 kam es zwischen 1988 und 2000 zu insgesamt 154 Fällen von MARV in der demokratischen Republik Kongo. Der größte Ausbruch von MARV bisher begann in 2004 in Uige, Angola mit 252 Fällen bis ins Jahr 2005, hierbei war die Letalitätsrate 90%. Danach traten in Uganda 2007 noch vereinzelte Fälle auf sowie 2008 ein aus Uganda nach Leiden (Niederlande) importierter Fall einer mit MARV infizierten niederländischen Touristin (WHO 1978; Johnson, Ocheng et al. 1983; Johnson, Johnson et al. 1996; CDC 2005; WHO 2007; WHO 2008).

EBOV trat erstmals 1976 mit zwei fast gleichzeitigen Ausbrüchen in der Demokratischen Republik Kongo (DRC) und dem Sudan auf, die jedoch von verschiedenen Virustypen ausgelöst wurden. Hier benannte man das Virus nach dem nahe dem Ausbruchgebiet liegenden Fluss Ebola. Der Ausbruch in DRC umfasste 318 Fälle mit einer Letalitätsrate von 88%, hier wurde die Spezies ZEBOV isoliert (Johnson, Lange et al. 1977). Im Sudan waren 284 Menschen betroffen, hier war die Letalitätsrate 55% und man isolierte das SEBOV (Murphy 1978). Morphologisch wurde eine große Ähnlichkeit mit MARV festgestellt, serologisch jedoch Unterschiede (Bowen, Lloyd et al. 1977; Pattyn, van der Groen et al. 1977).

Virus	Genus	Jahr	Ort	Humane Krankheitsfälle (Todesfälle)
Marburg		1967	Deutschland / Jugoslawien	3(7)
		1975	Zimbabwe	3(1)
		1980	Kenia	2(1)
		1987	Kenia	1(1)
		1998-2000	Demokratische Republik Kongo	154(128)
		2004-2005	Republik Angola	374(329)
		2007	Uganda	2(2)
		2008	Niederlande (aus Uganda importiert)	1(1)
Ebola	Sudan	1976	Sudan	284(141)
	Zaire	1976	Demokratische Republik Kongo	318(280)
	Zaire	1977	Demokratische Republik Kongo	1(1)
	Sudan	1979	Sudan	34(22)
	Reston	1989	USA	4(0)
	Reston	1992	Philippinen	0
	Reston	1992	Italien	0
	Zaire	1994	Gabun	49(29)
	Ivory Coast	1994	Elfenbeinküste	1(0)
	Zaire	1995	Demokratische Republik Kongo	315(243)
	Zaire	1996	Gabun	31(21)
	Zaire	1996	Gabun	60(45)
	Reston	1996	USA	0
	Sudan	2000-2001	Uganda	425(224)
	Zaire	2001-2002	Gabun/Republik Kongo	122(96)
	Zaire	2002-2003	Republik Kongo	143(129)
	Zaire	2003	Republik Kongo	35(29)
	Sudan	2004	Süd-Sudan	17(7)
	Zaire	2007	Demokratische Republik Kongo	264(187)
	Bundibugy	2007-2008	Uganda	149(37)
	Reston	2008	Philippinen	6(0)
	Zaire	2008-2009	Demokratische Republik Kongo	32(15)
	Sudan	2011	Uganda	1(1)

Tabelle 1: Ausbrüche von Filovirus-Infektionen (in Anlehnung an (CDC 2006 (updated 2010); CDC 2009 (updated 2010); WHO abgerufen am 06.06.2011)

1989 erkrankten in Reston (Virginia, USA) Cynomolgus-Affen (Gattung: *Macacca fascicularis*) aus den Philippinen an einem hämorrhagischen Fieber. Aus diesen Affen wurde ein weiterer Subtyp des EBOV isoliert, das Reston Ebolavirus (REBOV),

welches hoch pathogen für Affen ist, bei Menschen aber zu keiner Erkrankung führte (Jahrling, Geisbert et al. 1990). Seit einem Ausbruch von REBOV in den Philippinen unter Schweinen ist man sich ziemlich sicher, dass diese Spezies nicht human-pathogen ist (Barrette, Metwally et al. 2009).

In der Elfenbeinküste im Tai Nationalpark in kam es zwischen 1992-1994 immer wieder zu Todesfällen bei Affen, die durch ein hämorrhagisches Fieber ausgelöst wurden. Als Krankheitserreger wurde der bis dahin unbekannte Subtyp Ivory Coast Ebolavirus (CIEBOV) isoliert, von dem bisher ein einziger Fall beim Menschen bekannt ist: eine Wissenschaftlerin, die nach der Autopsie eines Affen aus diesem Gebiet erkrankte aber nicht starb (Le Guenno, Formenty et al. 1995; Formenty, Boesch et al. 1999).

2007-2008 kam es in Bundibugyo, Uganda zu einem Ebola-Ausbruch mit 149 Fällen, bei dem ein neuer Subtyp isoliert wurde, das Bundibugyo-Ebolavirus (Towner, Sealy et al. 2008).

Die Orte in denen es Ausbrüche von EBOV gab lassen sich geographisch zu einem so genannten „Ebola-Gürtel“ zusammenfassen, welcher sich in einem Bereich von 10° um dem Äquator befindet. In diesem ergaben Untersuchungen auch ein Vorkommen von filovirustypischen Antikörpern bei klinisch gesunden Personen (Slenzcka 1984; Hughes, Mann et al. 1986).

Wie sich 1996 bei Untersuchungen im Rahmen eines EBOV-Ausbruchs in Gabun ergab, kann eine EBOV-Erkrankung auch asymptomatisch verlaufen (Baize, Leroy et al. 1999; Leroy, Baize et al. 2000; 2001). Auch bei einem geringen Prozentsatz von deutschen Blutspendern, die niemals an hämorrhagischem Fieber erkrankt waren, konnten positive Reaktionen auf Filovirus-Antigene festgestellt werden (Becker, Feldmann et al. 1992). Dabei kann es sich um eine serologische Kreuzreaktion mit anderen Vertretern der Mononegavirales, die in diesen Breitengraden häufiger vorkommen, handeln, oder aber um ein bisher unentdecktes, nicht pathogenes Filovirus.

2002 wurde in Spanien und Frankreich ein Massensterben von Fledermäusen der Spezies *Miniopterus Schreiberisii* festgestellt (Negredo, Palacios et al. 2011). Aus den Kadavern konnte eine neue Spezies des Ebolavirus, das Lloviu Ebolavirus (LLOV) isoliert werden. Diese Entdeckung erregte Aufsehen, da vorher bei Fledermäusen und Flughunden nie eine klinische Infektion festgestellt werden konnte. Weiterhin kam es zu keiner bekannten Übertragung auf Primaten. Insgesamt gibt es bisher über 2000 bekannte Fälle von EBOV bei denen über 1400 Menschen starben (Groseth, Feldmann

et al. 2007). Nach den anfänglichen Ausbrüchen in den 70ern traten in den nachfolgenden 15 Jahren nur vereinzelte Fälle von EBOV auf, seit 1994 jedoch gibt es mehr Ausbrüche als je zuvor. Bei manchen Ausbrüchen wurde vermutet, dass sie in Zusammenhang mit dem Eindringen von Menschen in von ihnen bisher nicht bewohntes Gebiet standen (Feldmann, Czub et al. 2002). Filoviren zählen zu den so genannten „emerging viruses“, welche durch die veränderten Umweltbedingungen und der höheren Bevölkerungsdichte in den letzten 50 Jahren häufiger auftreten (Peters, Buchmeier et al. 1996; Nichol, Arikawa et al. 2000). Den Ausbrüchen von Ebola ging oft ein Massensterben von Affen in den betroffenen Regionen voraus, Erstinfektionen von Menschen durch den Kontakt zu den Kadavern oder den Verzehr von Affen wurden auch berichtet (Georges, Leroy et al. 1999; Leroy, Rouquet et al. 2004).

Die Frage nach dem Reservoir des EBOV und der Filoviren insgesamt ist noch nicht endgültig geklärt. Affen kommen hier nicht in Betracht, da sie selbst eine klinisch fulminante Infektion entwickeln (Simpson 1977; Fisher-Hoch, Perez-Oronoz et al. 1992; Ryabchikova, Kolesnikova et al. 1999). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass einige Flughundarten eine klinisch asymptomatische Infektion zeigen (*Hypsignatus monstrosus*, *Epomops franqueti* und *Myonycteris torquata*) und das Virus mit dem Kot ausscheiden (Leroy, Kumulungui et al. 2005). Bei einem EBOV-Ausbruch in der Demokratischen Republik Kongo konnte zudem nachgewiesen werden, dass der initial Erkrankte, wie in dieser Region üblich, Flughundfleisch zu sich genommen hatte (Leroy, Epelboin et al. 2009). Derzeitig geht man also davon aus, dass Flughunde das Reservoir darstellen. Es konnte auch gezeigt werden, dass das MARV in Moskitos der Spezies *Aedes aegypti* mehrere Wochen persistieren kann, die Epidemiologie der Ausbrüche machen diesen Übertragungsweg aber eher unwahrscheinlich (Kunz, Hofmann et al. 1968; Monath 1999). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch kann durch Haut- und Schleimhautläsionen und infizierte Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Sperma, Fäzes, Erbrechen, Schweiß) stattfinden (Simpson 1977; Mahanty und Bray 2004). Eine aerogene Transmission ist zwar unter experimentellen Bedingungen nachgewiesen worden, bei den bisherigen Ausbrüchen scheint sie allerdings keine Rolle gespielt zu haben (Jaax, Jahrling et al. 1995; Johnson, Jaax et al. 1995).

1.2 Klinik und Pathogenese des Ebolavirus

Nach einer Inkubationszeit von 2-21 Tagen (Median 9 Tage) manifestieren sich abrupt erste unspezifische Symptome wie Fieber, Kraftlosigkeit, Kopfschmerz, Anorexie, als auch Muskel- und Gelenkschmerz (Stroher und Feldmann 2006). Die Körpertemperatur steigt auf Werte über 39°C an. Im weiteren Verlauf können dann Erbrechen, Halsschmerzen, Bauchschmerzen und Durchfall hinzu kommen. Um Tag 5-7 tritt bei ungefähr der Hälfte der betroffenen Patienten ein maculopapulöses Exanthem auf, dass später abschuppt (Stroher und Feldmann 2006). Charakteristisch bei allen Patienten ist eine Verschlechterung der Blutgerinnung die durch Blutungen an Einstichstellen und Blut im Urin und/oder Fäzes auffallen kann, in fatalen Verläufen auch durch Hämorrhagien im Intestinalraum, Mund- oder Nasenschleimhaut oder konjunktivale Petechien. Im späten Stadium zeigen die Erkrankten Benommenheit, es kommt zum Nierenversagen und Anurie und es treten Symptome eines hypovolämischen Schocks auf, der jedoch nicht durch den Blutverlust zu erklären ist (Aleksandrowicz, Wolf et al. 2008). In diesem Stadium können die Erkrankten wieder normotherm sein. Konvaleszente Patienten können Myelitis, Hepatitis und Psychosen aufweisen, außerdem steigt das Risiko für Fehlgeburten (Bwaka, Bonnet et al. 1999).

Labordiagnostisch lassen sich eine Thrombozytopenie und Leukopenie nachweisen, sowie eine Linksverschiebung mit atypischen Leukozyten. Die partielle Tromboplastinzeit ist verlängert und Fibrinospaltprodukte (D-Dimere) sind nachweisbar. Die Serumtransaminasen sind als Zeichen der Lebermanifestation massiv erhöht. Hypotroteinämie und Proteinurie zeigen eine verringerte Nierenfunktion an. Hämorrhagische Diathese und Verbrauchskoagulopathie können zuerst zu einem hypovolämischer Schock und dann zum Multiorganversagen führen. Der Tod tritt zwischen dem 7. und 14. Krankheitstag ein (Stroher und Feldmann 2006). Letale Verläufe gehen oft mit einer hohen Viruslast (bis zu $3,4 \times 10^9$ Genomkopien pro ml Blut) und Immunsuppression einher (Baize, Leroy et al. 1999; Sanchez, Lukwiya et al. 2004).

EBOV repliziert sich nach Eintritt in den Organismus zuerst in den antigenpräsentierenden Zellen des mononukleär phagozytären Systems (MPS) der lokalen Lymphknoten und kann dann mittels Monozyten, Makrophagen und dendritischer Zellen über Blut- und Lymphgefäße in Leber und Milz gelangen und sich von dort in dem Rest des Organismus verbreiten.

Die infizierten Monozyten und Makrophagen schütten unkontrolliert pro-inflammatorische Cytokine aus, welche die Entwicklung der Schocksymptomatik vorantreiben (so genannter „Zytokinsturm“) (Stroher, West et al. 2001). Diese Cytokine werden für die Apoptose der Lymphozyten und damit für die Lymphopenie verantwortlich gemacht. Außerdem werden auch gefäßaktive Substanzen wie Stickstoffmonoxyd ausgeschüttet, die die Gefäßpermeabilität erhöhen. Als Folge davon steigt die Viskosität des Blutes an und es besteht eine höhere Gerinnungsneigung. Hierbei findet eine TNF α und IFN γ -vermittelte Reorganisation der Zell-Zell-Kontakte statt, die die endothelale Barrierefunktion aufhebt (Aleksandrowicz, Wolf et al. 2008).

Im Gegensatz zum Cytokinsturm der Monozyten und Makrophagen wird in infizierten dendritischen Zellen keine Cytokinausschüttung angeregt, dementsprechend kommen die dendritischen Zellen ihrer Funktion als T-Zell-Aktivator nicht mehr angemessen nach (Bosio, Aman et al. 2003; Mahanty, Hutchinson et al. 2003; 2004). Dadurch wird die adaptive Immunantwort verzögert oder bleibt ganz aus (*immune evasion*), und das Virus kann vom Wirtszellorganismus unerkant bleiben.

Die primären Zielzellen des EBOV spielen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Interferon (IFN)-Antwort. Inzwischen konnten mehrere Mechanismen bewiesen werden, mit denen EBOV selektiv die IFN- α und IFN- β Antwort der infizierten Zellen unterdrückt (Basler und Amarasinghe 2009).

Es konnte nachgewiesen werden, dass in Laufe einer EBOV-Infektion Thromboplastin (*tissue factor*) auf Monocyten und Makrophagen exprimiert und von diesen abgegeben wird, was in einer verstärkten Aktivierung der Gerinnungskaskade resultiert (Geisbert, Young et al. 2003). Diese Überaktivierung löst eine so gennante disseminierte intravasale Gerinnung (*disseminated intravascular coagulation, DIC*) oder Verbrauchskoagulopathie aus, welche eine charakteristische Manifestation der EBOV-Infektion ist. Hierbei werden die vorhandenen Gerinnungsfaktoren verbraucht, sodass es anschließend zu einer Gerinnungsneigung kommt. Diese DIC führt dann anscheinend zur hämorrhagischen Diathese und zusammen mit einer erhöhten Endotheldurchlässigkeit zur Schocksymptomatik (Takada und Kawaoka 2001). Da die Mechanismen des von EBOV ausgelösten hämorrhagischen Fiebers und die Mechanismen die septischem Schock unterliegen ähnlich zu sein scheinen, nutzt man den in der Sepsis gebräuchlichen Faktor VIIa-Inhibitor auch in der Therapie des EBOV aus (Geisbert et al., 2003).

Histopathologisch sind ausgeprägte Organnekrosen charakteristisch, im frühen Stadium der Infektion vor allem in Lymphknoten, Milz und Leber; später auch in Lunge und Niere (Feldmann, Bugany et al. 1996; Zaki 1997; Peters und LeDuc 1999).

1.3 Diagnose, Therapie, Prävention

Die unspezifischen Anfangssymptome der EBOV-Infektion machen eine klinische Diagnose zu Beginn der Krankheit schwierig. Oft fällt der Verdacht erst nach Nicht-Ansprechen auf Malariamedikamente oder Antibiotika auf EBOV, wenn es vielleicht bereits sekundär Infizierte gibt (Groseth, Feldmann et al. 2007). Deshalb ist zum Anfang einer Epidemie die Diagnose über den Nachweis des Virus besonders wichtig, dieser kann über RT-PCR, Antigen capture assays und IgM-ELISAs gestellt werden (Grolla, Lucht et al. 2005).

Da es bisher keine spezifische Therapie gegen eine EBOV-Infektion gibt, kann nur symptombezogen behandelt werden, im Vordergrund stehen dabei die Behandlung von Verbrauchskoagulopathie und hypovolämischen Schock. In der Vergangenheit haben Behandlungsversuche mit Serum von rekonvaleszenten Patienten, Pferde anti-EBOV Immunglobulinen, IFN, Heparin und dem Nukleosidanalogen Ribavirin nur wenig oder keine verlässlichen Effekte gezeigt (Feldmann, Jones et al. 2005).

Da es bei einer EBOV-Infektion zur Überexpression des prokoagulatorischen Thromboplastins (Faktor 3) kommt, liegt ein neuerer Behandlungsansatz in der Gabe eines rekombinanten Inhibitors des Gewebefaktors VIIa (rNAPc2). Hiermit konnten erste Erfolge im Tiermodell erzielt werden (Geisbert, Hensley et al. 2003). Ein weiterer aussichtsreicher Ansatz könnte die Gabe von rekombinantem menschlichem aktiviertem Protein C (rhAPC) sein, welches auch schon in der Therapie der Sepsis gebräuchlich ist (Hensley, Stevens et al. 2007).

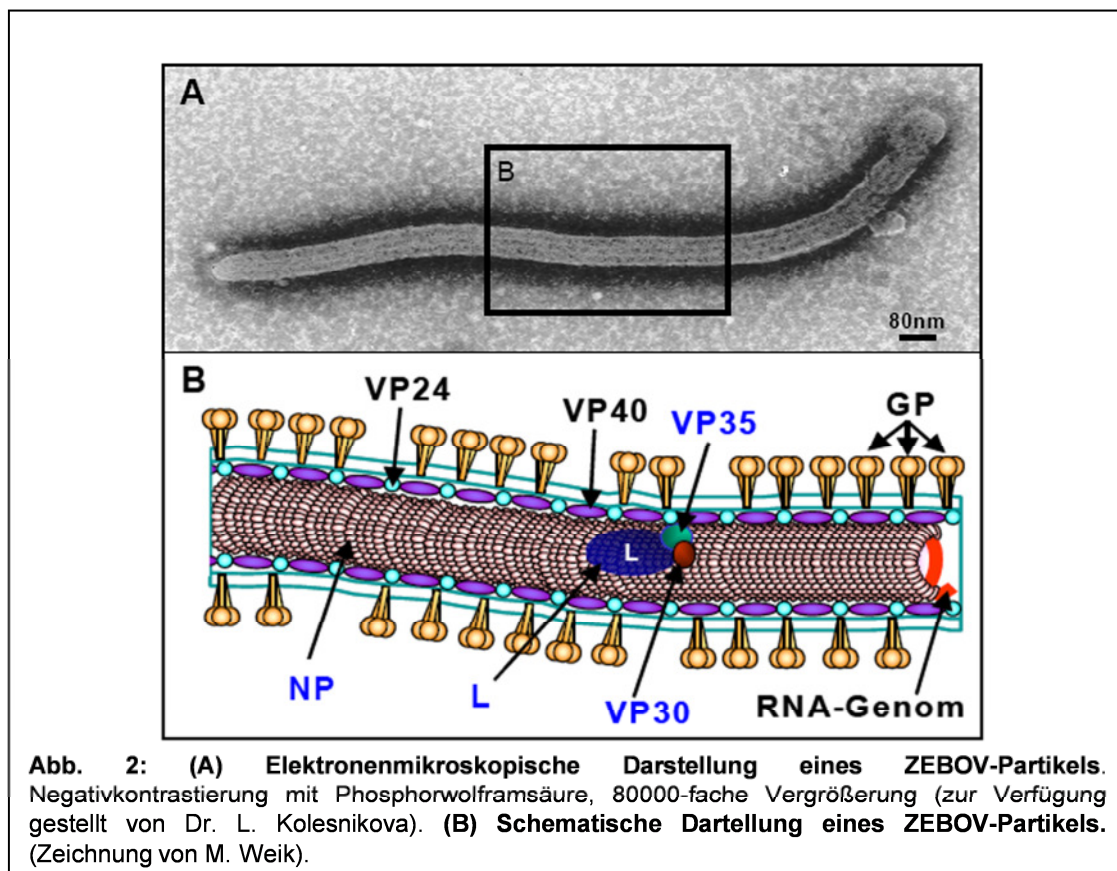
Ein Impfstoff gegen EBOV ist bisher nicht zugelassen, allerdings gibt es verschiedene aussichtsreiche Ansätze. Ein Ansatz ist die Entwicklung eines Impfstoffs auf der Basis eines attenuierten rekombinanten Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Mithilfe dieses replikations-kompetenten Vakzins kann das Glycoprotein von EBOV oder MARV präsentiert werden. In Versuchen mit diesem Impfstoff erlangten Affen (*Macacca fascicularis*) vollständigen Schutz vor der Infektion mit EBOV bzw. MARV. (Garbutt, Liebscher et al. 2004; Jones, Feldmann et al. 2005). Der Impfstoff kam auch bei einer Wissenschaftlerin aus Hamburg zum Einsatz, bei der nach einem Laborzwischenfall

der Verdacht auf eine EBOV Infektion bestand. Allerdings war nicht feststellbar ob der Impfstoff den Ausbruch der Krankheit verhindern konnte oder es gar nicht zur Infektion gekommen war (Tuffs 2009). Ein zweiter Impfstoffansatz ist ein replikations-defizientes Adenovirus, welches EBOV GP und NP exprimiert (Jones, Feldmann et al. 2005).

Auch durch die Verwendung von DNA-Vakzinen, Parainfluenzaviren oder Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) konnte man im Tiermodell einen Schutz vor EBOV- und MARV- Infektionen erzeugen (Sullivan, Sanchez et al. 2000; Baize, Marianneau et al. 2001; Warfield, Bosio et al. 2003; Swenson, Warfield et al. 2005; Wang, Raja et al. 2006).

1.4 Morphologie des Ebolavirus

Das EBOV bildet fadenförmige Partikel, die einen Durchmesser von 80 nm und eine durchschnittliche Länge von 1µm haben (Geisbert und Jahrling 1995). Die Partikel sind pleomorph, häufig sind sechsförmige oder langgestreckte Formen zu beobachten.



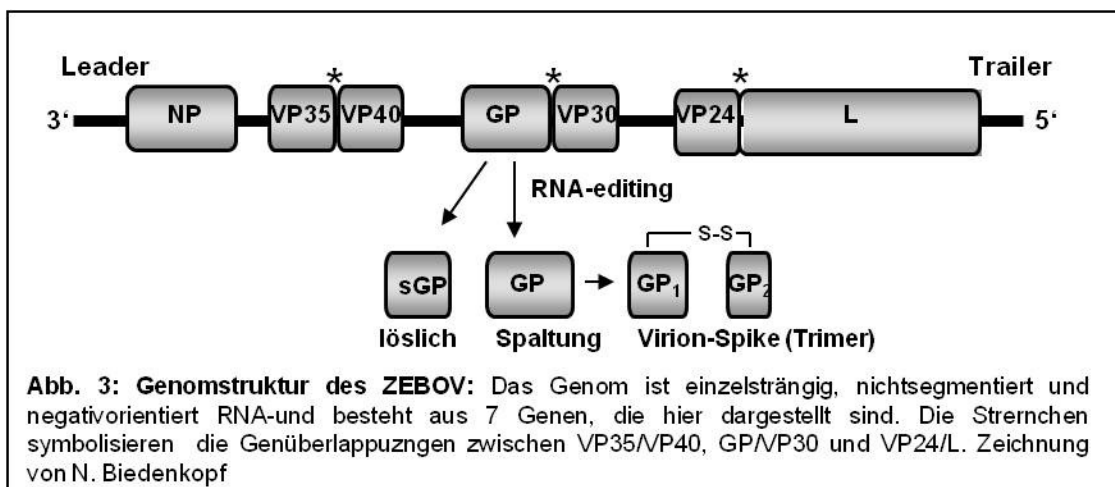
Die Viruspartikel bestehen außen aus einer Lipidmembran, die sich von der Wirtszelle ableitet und von Trimeren des viralen Glycoproteins GP durchsetzt ist. Das Innere setzt

sich aus vier Nukleokapsidproteinen und drei Matrixproteinen zusammen, die mit dem GP die sieben Strukturproteine des Ebola bilden.

Die virale RNA wird von einem tubulären Nukleokapsidkomplex mit helikalem Aufbau der ca. 50 nm Durchmesser hat, enkapsidiert. Dieser besteht aus dem Nukleokapsidprotein NP, der viralen Polymerase L, dem Polymerasekofaktor VP35 und dem Phosphoprotein VP30. Zwischen Nukleokapsidkomplex und Virushülle liegen die beiden Matrixproteine VP40 und VP24. Neueste Veröffentlichungen deuten allerdings darauf hin, dass VP24 enger mit dem Nukleokapsid assoziiert ist als bisher gedacht (Bharat, Riches et al. 2011; Bharat, Noda et al. 2012), sodass es in Zukunft eventuell auch den Nukleokapsidproteinen zugerechnet werden muss, oder zumindest nicht mehr als reines Matrixprotein gelten kann. Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme sowie eine Schemazeichnung eines EBOV-Partikels.

1.5 Genomstruktur des Ebolavirus

EBOV hat ein einzelsträngiges, unsegmentiertes RNA-Genom, welches durch seine negative Orientierung nicht infektiös ist (Kiley, Cox et al. 1988). Die sieben Gene werden von einer 3'-leader und 5'-trailer-Region eingefasst, die nicht codierend sind, aber wichtige Signale für Transkription, Replikation und Encapsidierung enthalten (Muhlberger, Weik et al. 1999). Die Gene überlappen sich oder sind durch intergenische Regionen getrennt und kodieren in der Reihenfolge 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5' für acht virale Proteine (bei MARV sind es nur sieben).



Das GP kodiert für zwei Proteine: die nicht modifizierte GP mRNA wird in sGP übersetzt, eine lösliche Form des GP, die nicht mit dem Viruspartikel assoziiert ist. In 20 % der Fälle entsteht durch mRNA-editing das Strukturprotein GP (Volchkov, Becker et al. 1995).

Transkriptionsstart- und Stoppsignale für die einzelnen Gene sind unter den Filoviren stark konserviert (Sanchez, Kiley et al. 1992).

1.6 Die viralen Strukturproteine

Das ZEBOV-Genom kodiert für sieben Strukturproteine: Das Glykoprotein GP als einziges Oberflächenprotein, die Matrixproteine VP40 und VP24 sowie die Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L.

NP Das Nukleoprotein (NP) ist das Produkt des ersten Gens und umfasst bei ZEBOV 739 Aminosäuren (AS) mit einem Gewicht von 115 kDa, womit es das größte Nukleoprotein der Mononegavirales ist. Anhand der Aminosäuresequenz wird für NP nur eine Molekulare Masse von 85 kDa vorausgesagt, jedoch konnte gezeigt werden, dass zwei innerhalb der Mononegavirales einzigartige Regionen (AS439-492 und 589-739) für die zusätzliche Masse verantwortlich sind (Shi, Huang et al. 2008). Diese Regionen enthalten viele saure Aminosäuren und scheinen auch für die Aufnahme des Nukleokapsids in Virionen wichtig zu sein.

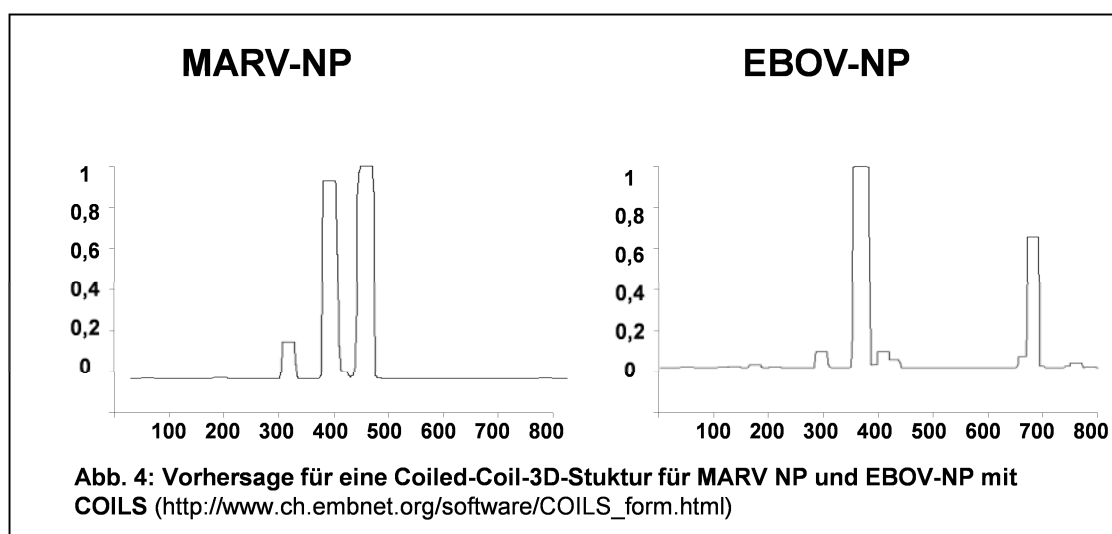
NP stellt die Hauptkomponente des Nukleokapsidkomplexes dar, es enkapsidiert die virale RNA und spielt eine zentrale Rolle bei Replikation und Transkription (Elliott, Kiley et al. 1985; Muhlberger, Weik et al. 1999).

Es lässt sich in eine hydrophobe N-terminale Hälfte und eine hydrophile C-terminale Hälfte unterteilen (Sanchez, Kiley et al. 1989). Der nicht phosphorylierte N-terminale Teil des MARV-NP besitzt eine hohe Sequenzhomologie mit dem des ZEBOV-NP und ist auch den Nukleoproteinen anderer Mononegavirales ähnlich, während der stark saure und phosphorylierte C-Terminus variabel ist (Sanchez, Kiley et al. 1992). Von MARV, welches ebenfalls phosphoryliert ist, weiß man, dass die Phosphorylierung wichtig für die Transkription ist und dass nur phosphoryliertes NP in die Virionen eingebaut wird (Elliott, Kiley et al. 1985; Becker, Huppertz et al. 1994; Lotfering, Muhlberger et al. 1999; DiCarlo 2004).

In Säugerzellen führt die Expression von NP zur Bildung intrazellulärer Einschlusskörper, so genannter *Inclusions*, die denen in Filovirus-infizierten Zellen sehr ähneln (Becker, Rinne et al. 1998; Modrof, Muhlberger et al. 2002). Wird NP zusammen mit VP35 oder VP30 exprimiert, so rekrutiert es diese Proteine in die Einschlusskörper, was auf eine Interaktion zwischen NP und VP35 bzw. NP und VP30 hindeutet (Becker, Rinne et al. 1998; Modrof, Becker et al. 2003).

NP ist auch in der Lage mit VP40 zu interagieren, hierfür sind N- und C-Terminus des NP essentiell (AS 1-150 und 601-739), diese Interaktion ist wiederum wichtig für die Inkorporierung von Nukleocapsiden in Virionen (Noda, Watanabe et al. 2007).

Die Region von AS1-450 ist essentiell für die Selbstinteraktion von NP (so genanntes *self-assembly*). Zusammen mit den nächsten 150 AS (AS1-600) entsteht ein NP-Fragment, das in der Lage ist, Nukleokapsid-artige Strukturen zu bilden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann solitär exprimiertes NP tubuläre Strukturen mit einem Durchmesser von 25 nm ausbilden, während Koexpression von NP mit VP35 und VP24 zu Nukleokapsid-ähnlichen Strukturen führt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass NP-Helices mit NP-RNA assoziiert sind und die Helices ihre Konformation verlieren, wenn die RNA abgebaut wird (Noda, Hagiwara et al. 2010), was daraufhin deutet, dass RNA ein essentieller Teil der Helices ist. Für MARV NP werden zwei Coiled-Coil-Domänen vorhergesagt (DiCarlo, Möller et al. 2007). Hierbei handelt es sich um seilartig umeinander gewundene α -Helices, eine 3D-Struktur die typischerweise eine Region anzeigt, über die Proteininteraktion vermittelt wird. Typisch für diese Regionen ist ein sogenannter *heptad repeat*, eine Folge aus sieben Aminosäuren, bei denen die erste und vierte Aminosäure hydrophob ist und die 3D Struktur vermittelt (Burkhard, Stetefeld et al. 2001).



Für die Coiled-Coil des MARV NP konnte experimentell eine wichtige Rolle für die Interaktion von NP mit sich selbst und VP35 nachgewiesen werden sowie eine essentielle Rolle bei der Bildung von Einschlusskörpern und in einem experimentellen System auch für die Replikation und Transkription (DiCarlo, Möller et al. 2007). Für EBOV kann in der Region von AS333-359 mittels Strukturvorhersage eine Coiled-Coil-Domäne angenommen werden (Abb. 4).

VP35 VP35 ist das Produkt des zweiten Gens des EBOV, es ist 340 AS lang Protein mit und hat ein Molekulargewicht von ca. 37 kDa. Obwohl es nicht phosphoryliert ist, bildet das VP35 das funktionelle Analogon zu den Phospho-Proteinen (P) der übrigen *Mononegavirales* (Becker, Rinne et al. 1998; Muhlberger, Lotfering et al. 1998; 1999; Muhlberger, Weik et al. 1999). VP35 hat eine Schlüsselrolle bei der viralen Transkription und Replikation als Polymerase-ko-Faktor, indem es mit NP und L interagiert und somit die Polymerase zur RNA rekrutiert (Groseth, Charton et al. 2009). Hierfür scheint die Oligomerisierung zu Homotrimeren, die über ein N-terminales Coiled-Coil-Motiv stattfindet, essentiell zu sein (Moller, Pariente et al. 2005; Reid, Cardenas et al. 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass VP35 auch mit VP40 und der viralen RNA interagiert und somit möglicherweise ein Bindeglied bei der Verpackung der RNA in Virionen darstellt (Johnson, McCarthy et al. 2006).

Eine weitere Funktion des VP35 ist seine Wirkung als Interferon(IFN)-Antagonist (Basler, Wang et al. 2000). Dabei blockiert VP35 unter anderem die Virus-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung der IFN-regulatorischen Faktoren (IRF) 3 und 7, die im aktivierten Zustand einen antiviralen Status innerhalb der Zelle erzeugen (Basler, Mikulasova et al. 2003). Weiterhin kann VP35 die antiviralen Effekte der Doppelstrang-RNA-abhängigen Proteinkinase PKR inhibieren und über ein C-terminal gelegenes basisches Motiv (AS 305–312) an doppelsträngige RNA binden und so das antivirale RNA-silencing unterdrücken (Hartman, Towner et al. 2004; Cardenas, Loo et al. 2006; Feng, Cervený et al. 2007; Basler und Amarasinghe 2009).

VP40 Das dritte Gen des EBOV kodiert für VP40 (39 kDa), welches aus 326 AS besteht. Nach NP kommt es im Virion am häufigsten vor. VP40 ist zwischen dem Nukleokapsidkomplex und der Virushülle lokalisiert und wird als homolog zu

Matrixproteinen der anderen Mononegavirales betrachtet, welche für den Zusammenbau (*assembly*) und dem Abknospen der Viruspartikel von der Zellmembran (*budding*) zuständig sind (Elliott, Kiley et al. 1985; Becker, Rinne et al. 1998).

Die Expression von VP40 in Säugerzellen führt zur Bildung von filamentösen *virus like particles* (VLPs), die einen kleineren Durchmesser haben als richtige Virionen (40-80 nm im Vergleich zu 80 nm) (Bavari, Bosio et al. 2002; Noda, Sagara et al. 2002; Kolesnikova und Becker 2004; Hoenen, Volchkov et al. 2005).

VP40 ist in zwei verschiedene Regionen unterteilbar, welche über ein flexibles Verbindungsstück verbunden sind. Mit dem C-Terminus kann VP40 an Lipidmembranen binden. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche die Oligomerisierung über den N-Terminus ermöglicht (Dessen, Volchkov et al. 2000; Ruigrok, Schoehn et al. 2000; Scianimanico, Schoehn et al. 2000; Timmins, Schoehn et al. 2003; Nguyen, Schoehn et al. 2005).

VP40 oligomerisiert zu Hexameren oder ringförmigen Oktameren, wobei letztere zur spezifischen RNA-Bindung fähig essentiell für die Virusreplikation sind (Gomis-Ruth, Dessen et al. 2003; Hoenen, Volchkov et al. 2005).

Für das *budding* des Virus ist ein prolinreiches Motiv, PTAPPEY, verantwortlich (Martin-Serrano, Zang et al. 2001; Licata, Simpson-Holley et al. 2003). Hierbei handelt es sich um eine so genannte „late domain“ mit der Viren mit den Proteinen des so genannten ESCRT Komplexes (*endosomal sorting complex required for transport*), interagieren, welche am Abschnüren von Vesikeln in das Innere der *multivesicular bodies* (MVB) beteiligt sind. Für das ZEBOV-VP40 konnte bisher eine Interaktion mit zellulärem Tsg101 und der Ubiquitin-Ligase Nedd4 nachgewiesen werden (Harty, Brown et al. 2000; Martin-Serrano, Zang et al. 2001; Timmins, Schoehn et al. 2003).

GP GP ist das Oberflächen-Glykoprotein des EBOV, umfasst 676 AS mit einem Gewicht von 150 kDa und wird vom vierten Gen des EBOV-Genoms kodiert. Das primäre Produkt ist ein lösliches sGP mit einer Länge von 364 AS, welches von infizierten Zellen ausgeschüttet wird und dessen Funktion möglicherweise im Abfangen von neutralisierenden Antikörpern besteht (Takada, Watanabe et al. 2001). Das Strukturprotein GP entsteht durch mRNA editing, hierbei wird in einer Folge von sieben Adenosinen ein achtes, nicht im Genom kodiertes Adenosin, eingefügt. Dieses führt zur Verschiebung des Leserahmens und somit zum Verschwinden eines Stopcodons,

wodurch eine mRNA entsteht, die für das Vollelänge-GP kodiert (Volchkov, Becker et al. 1995; Sanchez, Trappier et al. 1996).

Das GP gliedert sich in eine N-terminale luminale Domäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne, wobei der N-Terminus als Signalpeptid fungiert, welches nach Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten wird. GP ist ein Typ I Membranprotein und als einziges Oberflächenprotein als Homotrimer in die Hüllmembran des Virus eingelagert (Will, Muhlberger et al. 1993; Feldmann, Volchkov et al. 2001). GP wird am rER synthetisiert und anschließend im Golgi-Apparat durch eine Furin-Protease in die beiden Komponenten GP₁ und GP₂ gespalten (Volchkov, Volchkova et al. 1998). Das GP₂ ist membranverankert und hält das nicht-membrangebundene GP₁ durch eine Disulfidbrücke fest (Falzarano, Krokhin et al. 2006). Das GP₁ scheint für die Rezeptorbindung bei der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle zuständig zu sein (Manicassamy, Wang et al. 2005), während das GP₂ eine Fusionsaktivität zur Insertion der Virushülle in die Zellmembran aufweist (Ito, Watanabe et al. 1999). Der zelluläre Rezeptor wurde noch nicht eindeutig identifiziert, jedoch scheinen C-Typ-Lektine eine Rolle zu spielen (s. Kapitel 1.7, Viraler Lebenszyklus). Bei rekombinanter Einzelexpression wird GP über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert und in Vesikeln freigesetzt (Volchkov, Volchkova et al. 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die stark glykosylierte Mucin-Domäne des GP die Aktivierung dendritischer Zellen über den NFκB und MAP-Kinase-Signalweg vermittelt (Martinez, Valmas et al. 2007). Studien konnten außerdem einen cytotoxischen Effekt des GP für Gefäße beweisen (Yang, Duckers et al. 2000; Alazard-Dany, Volchkova et al. 2006). Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, dass GP in der Lage ist, die Restriktion des Virusfreilassung durch das durch IFN induzierte Protein Tetherin zu überwinden (Lopez, Yang et al. 2010).

VP30 Das VP30 hat eine Länge von 288 AS und ein Gewicht von 34kDa und bildet zusammen mit NP, VP35, L und dem RNA-Genom das Nukleokapsid. Da die meisten anderen Mononegavirales nur drei Nukleokapsidkomplexproteine besitzen, stellt VP30 bei EBOV als viertes Nukleokapsidprotein eine Besonderheit dar. Eine weitere Ausnahme ist M2-1 Protein der Pneumoviren (Familie Paramyxoviren) (García, García-Barreno et al. 1993).

VP30 wird als essentieller Aktivator der spezifischen Transkription benötigt, vermutlich um der Polymerase L zu helfen, eine Sekundärstruktur im 3'-Bereich der viralen RNA zu überwinden (Weik, Modrof et al. 2002). Zur Replikation des Virus wird es jedoch nicht gebraucht, Bei MARV wird es auch zur Transkription nicht gebraucht (Muhlberger, Weik et al. 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass VP30 eine Brücke zwischen der Polymerase L und dem NP bildet (Groseth, Charton et al. 2009).

Das VP30 ist N-terminal an zwei Serinclustern (AS 29-31; 42, 44, 46) und einem Threoninrest (AS 52) stark phosphoryliert. Ein vollständig phosphoryliertes VP30 kann mit den von NP gebildeten intracytoplasmatischen Einschlusskörpern kolokalisieren, jedoch wirkt es inhibierend auf die Transkription. Hingegen kann ein nicht-phosphoryliertes VP30 zwar die Transkription initialisieren, ist aber in der Interaktion mit NP-Einschlusskörpern gehemmt. Beide Aufgaben kann ein schwach phosphoryliertes VP30 ausüben (Modrof, Muhlberger et al. 2002). Es wird daher vermutet, dass die Phosphorylierung von VP30 den Wechsel zwischen viraler Transkription und Zusammenbau (*assembly*) der Nukleokapside reguliert. Auch die Fähigkeit des VP30 zur Transkriptions-Reinitiation, was zur Transkription der nachgeordneten Gene führt, hängt von seinem Phosphorylierungsstatus ab (Martinez, Biedenkopf et al. 2008).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von VP30 die Bindung an das Nukleokapsid vermittelt (Hartlieb, Muziol et al. 2007).

VP24 VP24 (28kDa) ist 251 AS lang und wurde lang als als Matrixprotein angesehen, (Elliott, Kiley et al. 1985; Becker, Rinne et al. 1998). Inzwischen deutet jedoch einiges auf eine engere Assoziation mit dem Nukleokapsidkomplex hin als ursprünglich angenommen (Bharat, Riches et al. 2011; Bharat, Noda et al. 2012). Die genaue Funktion von VP24 ist bisher unbekannt, es wird aber vermutet, dass VP24 eine Funktion bei Zusammenbau von Nukleokapsiden übernimmt (Huang, Xu et al. 2002; Hoenen 2006).

In MARV-infizierten Zellen verringerte sich durch das Abschalten des VP24 mittels RNA-Interferenz die Anzahl an freigesetzten viralen Partikeln, was vermuten lässt, dass auch MARV-VP24 eine Rolle beim Zusammenbau reifer Virionen spielt (Bamberg, Kolesnikova et al. 2005).

Weiterhin inhibiert VP24 die IFN-Antwort auf verschiedenen Wegen: es unterdrückt die Interferon (IFN) β -vermittelte Induktion von IFN-responsiven Genen (Basler, Mikulasova et al. 2003).

Außerdem kann es den für die IFN-Ausschüttung wichtigen STAT1 Signalweg hemmen, indem es zum einen an Karyopherin $\alpha 1$, einen Rezeptor für nukleäre Lokalisationssignale, bindet, und zum anderen den Import von STAT1 in den Zellkern blockiert (Reid, Leung et al. 2006).

L Das L-Protein ist das größte ZEBOV-Protein (2212 AS) und wird deshalb auch als large (L)-Protein bezeichnet. In infizierten Zellen kann es nur in katalytischen Mengen nachgewiesen werden (Kiley, Cox et al. 1988). Einzeln exprimiert bildet es in Säugetierzellen kleine Einschlusskörper rund um den Zellkern (Groseth, Charton et al. 2009). Dem L-Protein werden die enzymatischen Funktionen einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase zugeschrieben. Es konnten drei konservierte Regionen auf dem Protein identifiziert werden, die auch in Polymerasen anderer Vertreter der *Mononegavirales* zu finden sind (Poch, Blumberg et al. 1990; Muhlberger, Weik et al. 1999). Diese Regionen sind charakterisiert durch ein RNA-bindendes Motiv (AS 553-571), eine Domäne, die möglicherweise Phosphodiester-Brücken bildet (AS 738-744) und ein ATP-bindendes Motiv (AS 1815-1841) (Volchkov, Chepurinov et al. 2000).

1.7 Viraler Lebenszyklus

Der virale Lebenszyklus lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: zuerst die Bindung des Virus an einen zellulären Rezeptor und die Aufnahme in die Zielzelle, anschließend Replikation und Transkription und schließlich der Zusammenbau der Virusbestandteile und die Abschnürung von Tochterviren an der Plasmamembran der Zelle.

Da EBOV einen breiten Wirtszelltropismus zeigt, bindet es vermutlich nicht nur an einen zellulären Rezeptor (Becker, Spiess et al. 1995; Wool-Lewis und Bates 1998; Schnittler und Feldmann 1999; Yang, Duckers et al. 2000; Ito, Watanabe et al. 2001; Stroher, West et al. 2001). Als Rezeptoren werden verschiedenen C-Typ Lektine wie DC-SIGN, DC-SIGNR diskutiert, die vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden (Lin, Simmons et al. 2003; Simmons, Reeves et al. 2003; Marzi, Gramberg et al. 2004). Neuere Studien gehen davon aus, dass DC-SIGN und DC-SIGNR gar nicht selbst als Rezeptoren für EBOV fungieren, sondern nur die

Bindung der Viruspartikel an die Wirtszellmembran (*attachment*) vermitteln. So konnten experimentell manche B-Zell-Linien mit künstlichem DC-SIGN empfindlich für eine EBOV-Infektion gemacht werden und andere nicht (Marzi, Möller et al. 2007). Dies wird als Hinweis darauf gesehen, dass hier auch noch andere zelluläre Faktoren eine Rolle spielen. Die Rolle von DC-SIGN wird jetzt eher darin gesehen, Virionen an der Zelloberfläche zu konzentrieren, sodass auch Zellen mit wenigen Rezeptormolekülen infiziert werden können. Welche Rezeptoren dies nun sind, bleibt noch zu klären.

Der Eintritt des Virus in die Zielzelle erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endocytose (Empig (Mar'iankova, Glushakova et al. 1993; Empig und Goldsmith 2002; Falzarano, Krokhin et al. 2006). Hierbei wird das Virus zuerst mit Hilfe der N-terminalen Region des Oberflächenproteins GP₁ an die Zielzelle absorbiert. Dann wird GP in den Endosomen durch die Cathepsine B und L prozessiert und so in eine fusions-aktive Form umgewandelt (Chandran, Sullivan et al. 2005; Schornberg, Matsuyama et al. 2006). Durch den sauren pH des Endosoms kommt es zu einer Konformationsänderung im GP das zu einer Freilegung des hydrophoben Fusionspeptids führt, welches in die endosomale Membran eintaucht und die Verschmelzung mit der Virushülle möglich macht (Weissenhorn, Carfi et al. 1998; Weissenhorn, Dessen et al. 1999). Nun können die Nukleokapside ins Cytoplasma freigesetzt werden, wo anschließend Transkription und Replikation stattfinden (Feldmann und Kiley 1999; Ito, Watanabe et al. 1999).

Bei der Transkription kann man eine initiale Transkription von einer sekundären unterscheiden: da das Genom von EBOV negativsträngig ist, kann es nicht gleich als mRNA dienen, daher kann die primäre Transkription nur durch die RNP-Komponenten vermittelt werden, die im Virion mitgebracht wurden. Im Gegensatz dazu wird die sekundäre Transkription durch in der infizierten Zelle transkribierte und translatierte RNP-Komponenten vermittelt.

Sämtliche Proteine des RNP sind für die Transkription erforderlich, also NP, L, VP35 und VP30. VP30 als essentieller Transkriptionsaktivator hilft dem Polymerasekomplex (L und VP35) vermutlich, eine RNA-Sekundärstruktur im Transkriptionsstartbereich des ersten Gens (NP) zu überwinden (Weik, Modrof et al. 2002). Ergebnis der Transkription sind monocistronische polyadenylierte mRNAs, die nicht enkapsidiert werden (Muhlberger 2004). Da die sieben Gene des EBOV nacheinander abgelesen werden, kommt es vermutlich zur Entstehung eines mRNA-Gradienten, bei dem NP-spezifische mRNA am häufigsten transkribiert wird und die von L am wenigsten (Martinez, Biedenkopf et al. 2008). Die Transkripte enthalten lange nichttranslatierte Bereiche, die

möglicherweise regulatorische Funktionen bei der Proteinsynthese ausüben (Muhlberger, Trommer et al. 1996; Weik, Modrof et al. 2002).

Bei der anschließenden Replikation wird die genomische RNA durch die Polymerase in ein Antigenom umgeschrieben, welches wiederum als Matrize für die Synthese des Negativstrang-RNA-Genoms dient. Man vermutet, dass die Verfügbarkeit von NP eine wichtige Rolle für den Übergang zwischen Transkription und Replikation spielt: erst wenn genügend NP synthetisiert wurde, kann die neu synthetisierte genomische RNA enkapsidiert werden (Kolakofsky, Le Mercier et al. 2004). Für das Rabiesvirus konnte gezeigt werden, dass hier das Matrixprotein den Übergang zwischen Transkription und Replikation reguliert (Finke und Conzelmann 2003; Finke, Mueller-Waldeck et al. 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl VP24 als auch VP40 die Transkription und Replikation in einem Minigenomsystem regulieren können (Hoenen, Jung et al. 2010).

Der Übergang zwischen Transkription und Zusammenbau (*assembly*) scheint über den Phosphorylierungsstatus des VP30 reguliert zu sein. Ein nicht-phosphoryliertes VP30 kann zwar die Transkription initialisieren, ist aber in der für das assembly wichtigen Interaktion mit NP- Einschlusskörpern gehemmt. Ein phosphoryliertes VP30 kann mit NP interagieren, inhibiert aber die Transkription (Modrof, Muhlberger et al. 2002).

Die viralen Proteine werden fast alle im Cytoplasma translatiert, GP wird aufgrund seines Signalpeptids am ER synthetisiert (Kolesnikova und Becker 2004) und anschließend entlang des sekretorischen Wegs transportiert, posttranslational modifiziert (s. 1.4 Abschnitt GP) und in das endosomale Kompartiment relokalisiert, wo es mit dem VP40 zusammentrifft (Kolesnikova, Bamberg et al. 2004; Hartlieb und Weissenhorn 2006)

Die RNP-Proteine NP, VP35, VP30 und L akkumulieren in Einschlusskörpern, in denen sie sich mit dem replizierten RNA-Genom zu Nukleokapsidkomplexen zusammensetzen (*assembly*) (Kolesnikova und Becker 2004; Hartlieb und Weissenhorn 2006). Dabei scheint VP24 eine bisher nicht näher definierte Rolle zu spielen (s. 1.4, Abschnitt VP24). Es ist unklar, wie die Nukleokapside reifen und aus den Einschlusskörpern zur Plasmamembran als Ort der Freisetzung transportiert werden. Man konnte zeigen, dass VP40 mit NP in den Einschlusskörpern interagiert und möglicherweise durch weitere Interaktionen mit dem Zytoskelett zum Transport der Nukleokapside zur Plasmamembran beiträgt (Geisbert und Jahrling 1995; Becker, Rinne et al. 1998; Licata, Johnson et al. 2004; Ruthel, Demmin et al. 2005).

Für die Virusfreisetzung (*budding*) ist hauptsächlich das VP40 verantwortlich. Über seine *late domain*-Motive kann VP40 mit zellulären Proteinen wie Nedd4 oder Tsg101 interagieren (Licata, Simpson-Holley et al. 2003; Timmins, Schoehn et al. 2003) und dann mit der zellulären ESCRT-Maschine in *multivesicular bodies* gelangen. Für die Ausstülpung der Plasmamembran und Abschnürung der Viruspartikel sind der ESCRT-III-Komplex und Vps4 (eine Komponente der vakuolären Protein Sortierungsmaschinerie) verantwortlich (Babst, Katzmann et al. 2002; Babst, Katzmann et al. 2002; Hartlieb und Weissenhorn 2006). Man konnte zeigen, dass der *budding*-Prozess vorwiegend in Cholesterol- und Sphingolipidreichen Regionen in der Plasmamembran stattfindet, sog. *lipid rafts* (Bavari, Bosio et al. 2002).

Etwa 15 Stunden nach der Infektion werden die ersten ZEBOV-Partikel freigesetzt.

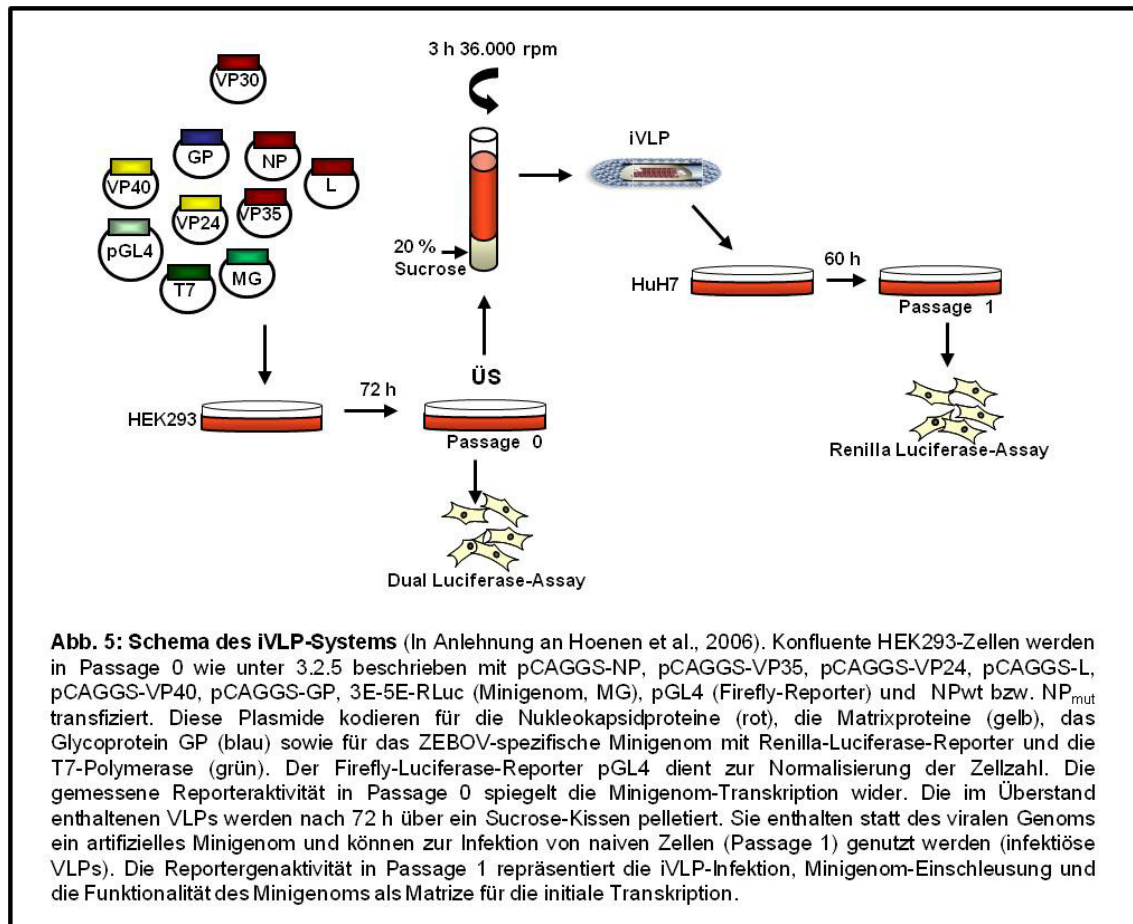
1.8 Der infektiöse VLP-Assay

Mit dem sogenannten infektiösen *VLP*-Assay kann man ohne infektiöse Viren den viralen Lebenszyklus untersuchen.

Das hier beschriebene System basiert auf einem Minigenomsystem, bei dem anstelle des viralen Genoms ein Reportergen steht, das von den 3'-*Leader* und 5'-*Trailer*-Regionen des ZEBOV-Genoms eingeschlossen wird, welche wichtige Signale für Replikation und Transkription enthalten (Muhlberger, Weik et al. 1999).

Zunächst werden Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für die viralen Proteine, das Minigenom sowie die T7 Polymerase kodieren (Passage 0). Die viralen Strukturproteine werden nun durch die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie synthetisiert. Das unter der Kontrolle eines T7-Promoters stehende Minigenom wird *in trans* erkannt und mit Hilfe der T7-Polymerase in eine negativsträngige RNA umgeschrieben, die durch NP enkapsidiert und wiederum als Matrize für die Transkription und Replikation durch den viralen Polymerase-Komplex dient. Die Expression der viralen Strukturproteine zusammen mit dem Minigenom führt zur Bildung und Freisetzung von iVLPs, die in Morphologie und Funktion Wildtyp-Virionen ähneln. Nach einem Aufreinigungsschritt mittels Ultrazentrifugation über ein Sucrosekissen können diese iVLPs zur Infektion weiterer Zellen verwendet werden (Passage 1), was Untersuchungen zum Zelleintritt, viraler primärer Transkription sowie über die Funktionalität des Minigenoms zulässt. Die Effektivität der viralen Transkription wird durch einen Reporterassay bestimmt.

In dieser Arbeit wurde das von (Hoenen, Groseth et al. 2006) modifizierte iVLP-System benutzt, welches einen Renilla-Luciferase-Reporterprotein verwendet. Während in der Passage 0 die transfizierten Plasmide für die Transkription des Minigenoms zur Verfügung stehen, sind in der Passage 1 („Infektion“) nur die in den VLPs enthaltenen Proteine für die Transkription verfügbar.



1.9 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Coiled-Coil -Domäne des Nukleoproteins NP.

Hierbei soll sowohl die Rolle des Coiled-Coil-Motivs bei der Interaktion mit anderen Nukleokapsidproteinen, beim *self-assembly* des NP als auch dessen Einfluss auf die Transkription und die Bildung von NP-Helices untersucht werden. In vorangehender Arbeit wurde bereits eine Vorhersage der Coiled-Coil -Region des EBOV erstellt sowie zwei Mutanten, eine mit vollständig deletierter Coiled-Coil-Domäne und eine mit

einigen Punktmutationen, die in der 3D-Strukturvorhersage keine Coiled-Coil mehr aufweisen (Nadine Biedenkopf, mündlich). Folgende Fragen sollten untersucht werden:

1. Einfluss der Coiled-Coil Region auf die Interaktion mit Nukleokapsidproteinen

Es ist bekannt, dass NP mit den Nukleocapsidproteinen VP30 und VP35 interagiert. Es sollte nun herausgefunden werden, in wie weit diese Interaktion durch die Coiled-Coil vermittelt wird. Dabei wurde das Verhalten von NPwt mit dem der Mutanten bei Koloalisationsstudien in der Immunfluoreszenz und in der Koimmunpräzipitation verglichen.

2. Einfluss der Coiled-Coil Region auf das Self-assembly des NP

Auch hier sollte untersucht werden, in wie weit die Coiled-Coil-Region des NP ausreichend für diese Funktion des NP's ist. Dabei wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Komplementierungsassay untersucht, ob die wildtypische Coiled-Coil-Domäne mit sich selbst oder mit einer mutierten Coiled-Coil-Domäne interagieren kann.

3. Einfluss der Coiled-Coil Region auf die auf die virale Transkription

Die Coiled-Coil-Region liegt in einem Bereich, in dem Deletionen einen dominant negativen Effekt auf die Transkription haben können (Watanabe, Noda et al. 2006). Hier sollte untersucht werden, ob durch eine deletierte oder mutierte Coiled-Coil solch ein Effekt erreicht werden kann. Hierzu wurden der Wildtyp und die Mutanten im *iVLP-assay* in ihrem Verhalten in Passage 0 und 1 verglichen.

4. Einfluss der Coiled-Coil Region auf die Bildung von NP-Helices

Hierbei sollte untersucht werden, in wie weit die Mutanten noch die Bildung regulärer NP-Helices vermitteln können. Dazu wurden NP Wildtyp und Mutanten einzeln und zusammen exprimiert, aufgereinigt und im Elektronenmikroskop analysiert.

2. Material

2.1 Chemikalien

Agarose PeqGold universal

Alcyan Blue

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin (Natriumsalz)

Bacto™-Agar

Beetle-juice

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau (BPB)

Calciumchlorid (CaCl₂ x 2H₂O)

Caseinhydrolysat

Chloroform

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Cycloheximid

D(+)- Glucose

Dextranblau

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dinatriumcarbonat (Na₂CO₃)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)

Essigsäure (HAc)

Ethanol abs. (EtOH)

Ethanol vergällt (EtOH)

Ethidiumbromid

Fluoprep

Formvar

Peqlab, Erlangen (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Biorad, Hercules (USA)

Serva, Heidelberg (D)

Becto, Dickinson & Company, Sparks (USA)

pjk, Kleinblittersdorf (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Merck, Darmstadt (D)

Acros Organics, Geel (B)

Roche Diagnostics, Indianapolis (USA)

Sigma-Aldrich, München (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Thermo Fisher, Hudson (USA)

Merck, Darmstadt (D)

Merck, Darmstadt (D)

Roth, Karlsruhe (D)

Merck, Darmstadt (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Fischar, Saarbrücken (D)

Promega, Mannheim (D)

BioMérieux, Nürtingen (D)

Sigma-Aldrich, München (D)

Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt (D)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, München (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe (D)
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt (D)
6X MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de-Haën, Seelze (D)
N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo (N)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Phosphorwolframsäure	Serva, Heidelberg (D)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München (D)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
Renilla-juice	pjk, Kleinblittersdorf (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen (D)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford (USA)
Sucrose	Serva, Heidelberg (D)
N, N, N', N' - Tetramethylethyl-ethylendiamin (TEMED)	Biorad, Hercules (USA)
TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX- 100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, München (D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

6 well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Blottingpapier <i>GB 002</i> (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Cellulosenitratfolie <i>PROTRAN</i> ®, Ø 0,45 µm	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Gewebekulturröhrchen (TC-Tube)	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt (D)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-tubes, 0.2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml, <i>Cellstar</i> ®	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen 0.1-1µl, 10-100µl, 100-1000µl, <i>TipOne</i> ® (steril, unsteril)	Starlab, Ahrensburg (D)
Pipettenspitzen, 1250 µl, <i>Matrix</i> ®	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/ 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.22	Feather, Osaka (J)
Sterilfilter Ø 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg (D)
Zentrifugenröhrchen <i>Microfuge® Tube</i>	Beckmann, Palo Alto (USA)
<i>Polyallomer</i> für TLA45	
Zentrifugenröhrchen, <i>Ultraclear™</i> für SW41, SW60	Beckmann, Palo Alto (USA)

2.3 Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen (D)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

2.4 Geräte

Brutschrank <i>HERAcell150, HERAcell240</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Eppendorf Kühlzentrifuge <i>5415R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf <i>Reference®</i> Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert200M</i>	Zeiss, Jena (D)
Folienschweißgerät	Severin, Sundern (D)

Geldokumentationssystem <i>GelDoc 2000</i>	Biorad, Hercules (USA)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel (D)
Horizontalschüttler <i>TR</i>	Infors AG, Bottmingen (CH)
Lichtmikroskop <i>Wilovert</i> [®]	Will, Wetzlar (D)
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat <i>TCS</i>	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Minizentrifuge <i>GMC-060</i>	neoLab [®] , Heidelberg (D)
<i>Odyssey Infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
PCR Cycler <i>Primus 25</i>	Peglab, Erlangen (D)
pH-Meter $\Phi 32$	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Pipettierhilfe <i>pipetboy</i>	Integra Bioscience, Chur (CH)
Power Supply PowerPac [™] HC	Biorad, Hercules (USA)
Power Supply <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen (D)
Reagenzglasnischer <i>Vortex</i>	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Rotor Ultrazentrifuge SW41, SW60	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
SDS-Gelkammern <i>Mini-Protean</i>	Biorad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparatur <i>Trans-Blot SD</i>	Biorad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Haraeus, Frankfurt (D)
Spektralphotometer <i>Nanodrop ND1000</i>	Peglab, Erlangen (D)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischfuge <i>Spectrafuge</i> [®]	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Tischkühlzentrifuge <i>Multifuge 3S-R</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Ultrazentrifuge <i>Optima</i> [™] L-100K/ -80XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Ultrazentrifuge <i>TL100</i>	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Vakuumpumpe <i>Mini-Vac E1</i>	Axonlab, Reichenbach (D)
Waage <i>explorer Pro</i>	Ohaus
Wasserbad <i>MT</i>	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer

Blockierungspuffer für IF	2 %	Bovines Serumalbumin (BSA)
	5 %	Glycerin
	0,2 %	Tween [®] 20
	0,05 %	Natriumazid (NaN ₃)
		in PBS _{def}
Blockierungspuffer für WB	10 %	Magermilchpulver
		in PBS _{def}
DNA-Probenpuffer (6x)	0,09 %	Bromphenolblau
	0,09 %	Xylene Cyanol FF
	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
KoIP-Puffer	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 %	NP40
Lysis-Puffer für EM- Proben	10mM	TrisHCl [pH 7,8]
	0,15M	NaCl
	1mM	EDTA
	1%	NP40
PBS _{def} , pH 7.5	8 g	NaClNa
(Phosphatpuffer deficient)	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1 l	dH ₂ O
Proteingellaufpuffer (10x)	10 g	SDS
	30 g	Tris

	144 g Glycin ad 1 l dH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 6.8 0,4 % SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8 0,4 % SDS
50× TAE, pH 8,0	242 g Tris-Base 57,1 g Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 l dH ₂ O
TNE-Puffer (1x)	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8
Transferpuffer (1x)	300 mg Tris 144 mg Glycin 100 ml Ethanol ad 1 l dH ₂ O
Verdünnungspuffer für WB	1 % Magermilchpulver 0,1 % Tween [®] 20 in PBS _{def}
Waschpuffer für WB	0,1 % Tween [®] 20 in PBS _{def}

3.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg ad 1 ml	Ampicillin dH ₂ O
Entwickler für Röntgenfilme	1 L 0,25 L 1,5 L	Lösung A Lösung B dH ₂ O
Fixierer für Röntgenfilme	0,5 L 1,9 L	Rapid Fixierer H ₂ O
PMSF-Stammlösung (100 mM)	360 mg ad 21 ml	PMSF Isopropanol

2.6 Wachstumsmedien

2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Medium	10 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
	10 g Pepton
	ad 1 l dH ₂ O

2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
DMEM (++++)	500 ml DMEM
	50 ml FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml

DMEM (+ Q)	500 ml 5 ml	DMEM L-Glutamin 200 mM (100x)
DMEM (+ Q / + 5% FCS)	500 ml 25 ml 5 ml	DMEM FCS (Fötales Kälberserum) L-Glutamin 200 mM (100x)
DMEM (++ / 2% FCS)	500 ml 10 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS (Fötales Kälberserum) L-Glutamin 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
Fötales Kälberserum (FCS)		PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)
OPTI-MEM® I		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Trypsin-EDTA (0,5%)		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)

2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.7.1 Nukleinsäuren als Größenmarker

O'Gene Ruler™ 1 kb plus DNA Ladder, 75-20.000 bp	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
O'Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, 50-1.000 bp	Fermentas, St.Leon-Rot (D)

2.7.2 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dCTP	2'-Desoxycytosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)

2.7.3 DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen/ Mutagenesen)

<u>Nr.</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
1233	pCAGGS-forw	CCT TCT TCT TTT TCC TAC AG
1234	pCAGGS-rew	CCT TTA TTA GCC AGA AGT CAG
2444	NP, Seq Primer nt 802 for	GCA AGG ACC GCC AAG GTA AAA
2715	YFP1 fwd	CCTCCTCGGCCTGGCCGTCGCCTCC
2716	YFP1 rev	CCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCC
2717	YFP2 fwd	CGGCCTCCTCGGCCTGGCCGTCGCCTCCCGGG
2718	YFP2 rev	GGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCG
2859	NPcc XhoI for	GCA GCA <u>CT CGA</u> <u>GGG</u> GGA GTA AAT GTT GGA GAA C
2860	NPcc XhoI rev	GCA GCA CTC GAG TCA AAG ATG GTC AAG TTC GCG
2861	NPcc EcoRI for	GCA GCA <u>GAA TTC</u> GCC ACC ATG GGA G TAAATGTTG
2862	NPcc ClaI rev	GCA GCA <u>ATC GAT</u> AAG ATG GTC AAG TTC GCG AGA C

Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen wurden unterstrichen. Die Primer #1233 und #1234 wurden von der Firma MWG Biotech (München) synthetisiert. Die Primer #2444 bis #2862 wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

2.8.1 Vektoren

pCAGGS-MCS_WPG	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCDNA3	Clontech, Mountain View (USA)

2.8.2 Rekombinante Plasmide

Minigenom 3E5E-RLuc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_GP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_L	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)
pCAGGS_VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-T7	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
pCAGGS_VP24	Institut für Virologie, Marburg

pCAGGS_VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_VP30f	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_VP35f	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_NP flag	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_NP myc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_NPccmut myc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS_NPΔcc myc	Institut für Virologie, Marburg
pCDNA3_ERGIC-YFP1	Institut für Virologie, Marburg
pCDNA3_ERGIC-YFP2	Institut für Virologie, Marburg
pCDNA3_MCDF2-YFP1	Institut für Virologie, Marburg
pCDNA3_MCDF2-YFP2	Institut für Virologie, Marburg

<u>Kloniertes Plasmid</u>	<u>Matrizen</u>	<u>Oligonukleotide</u>	<u>Zielvektor</u>
pCDNA3_YFP1-NPcc	pCDNA3_ERGIC-YFP1	#2859, #2860	pCDNA3
pCDNA3_YFP2-NPcc	pCDNA3_ERGIC-YFP2	#2859, #2860	pCDNA3
pCDNA3_NPcc-YFP1	pCDNA3_MCDF2-YFP1	#2861, #2862	pCDNA3
pCDNA3_NPcc-YFP2	pCDNA3_MCDF2-YFP2	#2861, #2862	pCDNA3
pCDNA3_NPccmut-YFP1	pCDNA3_MCDF2-YFP2	#2861, #2862	pCDNA3
pCDNA3_NPccmut-YFP2	pCDNA3_MCDF2-YFP2	#2861, #2862	pCDNA3
pCDNA3_YFP1 leer	pCDNA3_ERGIC-YFP1		pCDNA3
pCDNA3_YFP2 leer	pCDNA3_ERGIC-YFP2		pCDNA3

Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte mit der internen Labornummer (#n), deren genaue Bezeichnung und Sequenz unter 2.7.3 verzeichnet ist.

2.9 Proteine, Peptide und Aminosäuren

2.9.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Proteinase K (0,9 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Pwo DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab, Erlangen (D)
Restriktionsendonukleasen: ClaI (20 U/μl), EcoRI (20 U/μL), XhoI (20 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)

2.9.2 Antikörper und Affinitätsgele

Erstantikörper

Maus α-flag M2 monoklonal	1:150
Kaninchen α-myc monoklonal	1:50
Ziege α-GFP polyklonal	1:500
α-c-myc monoklonal, Maus	1:500
α- flag TM M2, monoklonal, Maus	1:100
α- flag TM BioM2, monoklonal, Maus	1:500
α-EBOV GP/NP Serum, Ziege	1:30000
α-VP40 Serum, Meerschweinchen	1:1000

Zweitantikörper

Esel α-Maus Texas Red	1:100
Esel α-Kaninchen FITC	1:100
Esel α-Ziege Rhodamin	1:100
Ziege α-Maus, IRDye800	1:10.000
Esel α-Maus, <i>AlexaFluor</i> [®] 680-gekoppelt (H+L)	1:10.000
Esel α-Ziege <i>AlexaFluor</i> [®] 680-gekoppelt (H+L)	1:10.000
Ziege α-Meerschweinchen, IRDye 800	1:10.000
Esel α-Ziege, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	1:30.000

ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich, München (D)

2.9.3 Proteinmarker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa Fermentas, St.Leon-Rot (D)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, 10-250 kDa Fermentas, St.Leon-Rot (D)

2.10 Zellen

2.10.1 Prokaryotische Zellen

E. cXL1-Blue

Stratagene, Heidelberg (D)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]

2.10.2 Eukaryotische Zellen

293FR-Zellen humanen embryonalen Nierenzellen

HUH7-Zellen humane Hepatomazelllinie

3. Methoden

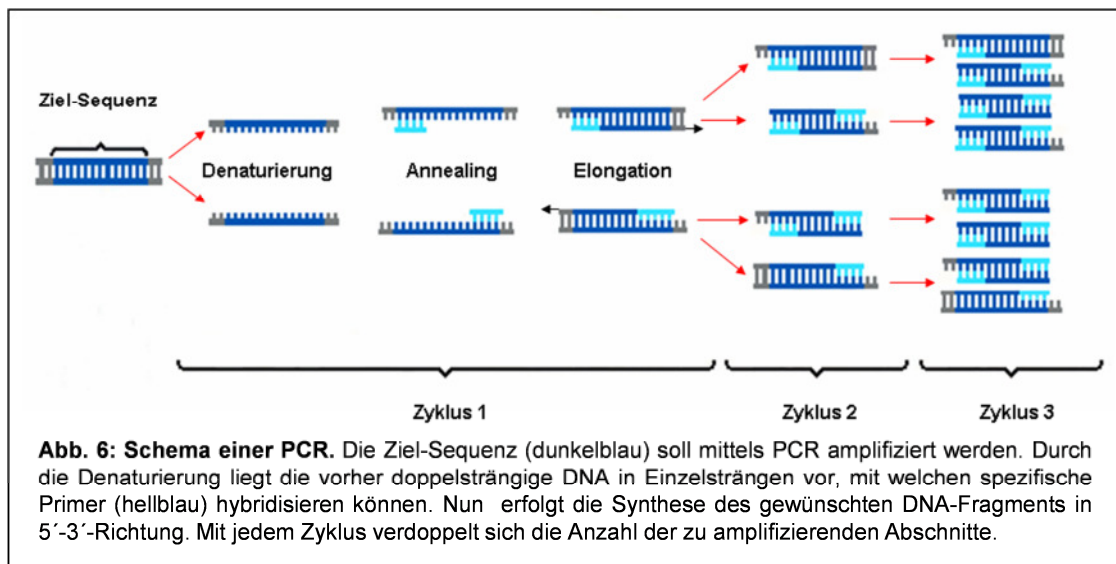
Die Methoden dieser Arbeit wurden zum Teil (bis auf die Unterkapitel 3.2.4, 3.2.5.2., 3.2.6, 3.3.4 und 3.3.5) wie von Mittler publiziert übernommen und modifiziert (Mittler 2009).

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Ketten

Reaktion (PCR)

Die PCR wird verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Jede Reaktion benötigt einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer, die an jeweils einen DNA-Strang binden und die Zielsequenz einrahmen. Die Primer bestehen aus je ca. 15 bis 25 Nukleotiden, die das 5'- und das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definieren. Je nach Klonierungsstrategie können Primer im 5'-Bereich zusätzliche Sequenzen z.B. für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthalten, die nicht spezifisch für die zu amplifizierende DNA sind.



Im ersten Schritt des Amplifikationszyklus (Denaturierung) wird die DNA-Matrize durch Erhitzen in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Basenzusammensetzung und Länge der Primer festgelegte Temperatur abgekühlt, damit diese an die komplementären Sequenzabschnitte der

einzelsträngigen DNA-Matrize binden können (Annealing). Ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers erfolgt im letzten Schritt die Synthese des Doppelstranges (Elongation). Die dafür verwendete hitzestabile *Pwo* DNA-Polymerase verfügt neben ihrer 5'-3'-Polymerasefunktion über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese wird auch als Korrekturlesefunktion bezeichnet und gewährleistet die hohe Lesegenauigkeit der *Pwo* DNA-Polymerase. Der Reaktionszyklus durchläuft etwa dreißig Wiederholungen, wobei die zu amplifizierende DNA exponentiell im Reaktionsgemisch angereichert wird. Der Reaktionszyklus durchläuft etwa vierzig Wiederholungen, wobei die zu amplifizierende DNA exponentiell im Reaktionsgemisch angereichert wird. Die dafür verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerasen verfügen neben ihrer 5'-3'-Polymerasefunktion über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, durch welche falsch angefügte Nukleotide direkt erkannt, entfernt und korrigiert werden können. Durch diese Korrekturlesefunktion wird die hohe Lesegenauigkeit der Polymerasen gewährleistet.

Reaktionsansatz <i>Pwo</i> :	100 ng	cDNA
	0,5 µl	100 µM Vorwärts-Primer
	0,5 µl	100 µM Rückwärts-Primer
	je 2 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 µl	10× Puffer für <i>Pwo</i> DNA-Polymerase (komplett)
	2 µl	<i>Pwo</i> DNA-Polymerase
	ad 100 µl	dH ₂ O

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94 °C	2 min
Denaturierung	10	94 °C	30 sec
Annealing		55 °C	30 sec
Elongation		72 °C	3 min
Denaturierung	20	94 °C	30 sec
Annealing		50 °C	30 sec
Elongation		72 °C	3 min + 20 sec/ Zyklus
Elongation	1	72 °C	10 min
Ende der Synthese	1	8 °C	∞

Die Überprüfung der PCR erfolgt im analytischen DNA-Agarosegel (3.1.3.1). Zur Vermeidung von Verunreinigungen, z.B. durch akkumulierte Primer (so genannte *primer-dimer*) werden die DNA-Fragmente über ein präparatives DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.3.2) und durch Gelextraktion isoliert (3.1.4).

3.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Vor der Verwendung von DNA in molekularbiologischen Experimenten ist es erforderlich, Kontaminationen mit z.B. Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien, Salzen, Primern oder Proteinen zu entfernen, da diese einen negativen Einfluss auf nachfolgende biochemische Reaktionen haben könnten.

DNA-Fragmente, die größer als 100 bp sind, können nach biochemischen Reaktionen, wie z.B. PCR (3.1.1) oder Restriktionsverdau (3.1.5), mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* vom restlichen Ansatz getrennt werden. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenmatrix und wird entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt.

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wanderung erfolgt von der Kathode zur Anode, wobei die netzartige Struktur der Agarose bewirkt, dass sich die DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell fortbewegen. Durch die Agarose-Konzentration kann die Porengröße des Gels bestimmt und so die Auftrennung von besonders langen oder kurzen DNA-Fragmenten ermöglicht werden. Die Größe unterschiedlicher DNA-Fragmente kann mit Hilfe eines geeigneten DNA-Größenstandards abgeschätzt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid und von UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$ oder 360 nm) werden die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach enzymatischen Reaktionen verwendet man analytische DNA-Agarosegele, wohingegen präparative DNA-Agarosegele zur Aufreinigung von Nukleinsäuren benutzt werden. Die Gele unterscheiden sich in der eingesetzten Konzentration der Agarose und dem einzusetzenden Probenvolumen.

3.1.3.1 Analytische DNA-Agarosegele

Agarosegel: 1 % - 2 % (w/v) Agarose, in 1x TAE-Puffer gelöst

Laufpuffer: 1x TAE-Puffer; pH 8,0

Die Agarose wird durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben (10 % des Endonukleaseverdaus) werden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard im polymerisierten Agarosegel bei 100 Volt und maximaler Stromstärke ca. 40 min aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für 20-30 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert. Im Anschluss an die Färbung der DNA wird diese mit Hilfe des Geldokumentationssystems *Ge/Doc 2000* unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) visualisiert und dokumentiert.

3.1.3.2 Präparative DNA-Agarosegele

Agarosegel: 2 % - 3 % (w/v) Agarose, in 1x TAE-Puffer gelöst

Laufpuffer: 1x TAE-Puffer; pH 8,0

Der Aufbau und die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen der analytischen DNA-Agarosegele. Das Probenvolumen liegt bei präparativen Agarosegelen meist bei 40 - 60 µl, und es ist zu beachten dass für ein präparatives Agarosegel frischer Puffer verwendet werden sollte. Nach Anfärben der DNA in frischer Ethidiumbromidlösung werden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ($\lambda = 360 \text{ nm}$) mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wird anschließend mit dem *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (3.1.4) entsprechend der dem Kit beiliegenden Arbeitsanleitung aus dem Gel isoliert.

3.1.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgt mithilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung. Die DNA wird nach Reinigung über eine Säulenmatrix in 50 µl dH₂O eluiert.

3.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) können mithilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen hydrolytisch gespalten werden. Dabei erkennen diese Endonukleasen palindromische Sequenzen im DNA-Doppelstrang an denen der Phosphodiesterstrang geöffnet wird. Man kann die Restriktionsenzyme präparativ zum Herausschneiden eines Inserts aus einem Vektor oder zur Analyse von DNA verwenden, wobei zwei DNA-Moleküle, die sich in Anzahl oder Position der Schnittstellen unterscheiden, nach einem analytischen Restriktionsverdau und Elektrophorese im Agarosegel (3.1.3.1) unterschiedliche Bandenmuster erzeugen. Der Reaktionsansatz wird entsprechend der Herstellerangaben bezüglich Pufferbedingungen, Temperaturoptimum und Zusatz von BSA inkubiert (nach Aktivität des verwendeten Enzyms 2-5 h). Ein Restriktionsverdau kann gleichzeitig mit zwei Endonukleasen erfolgen, sofern diese hinsichtlich ihrer Reaktions- und Temperaturbedingungen kompatibel sind. Andernfalls wird die DNA nacheinander mit den gewünschten Enzymen verdaut, wobei nach dem ersten Verdau entweder das Enzym durch eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (3.1.2) entfernt oder durch Erhitzen auf 65 °C inaktiviert werden kann. Soll die DNA in weiteren Reaktionen verwendet werden, müssen Enzym- und Pufferrückstände sowie kleine DNA-Fragmente entfernt werden. Diese Aufreinigung erfolgt mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (3.1.2) oder über ein präparatives Agarosegel (3.1.3.2) mit anschließender Gelextraktion (3.1.4).

Ansatz für analytischen Verdau:	0,1 – 0,5 µg	DNA
	1 µl	10x Puffer geeigneter Ionenstärke
	(1 µl	10% BSA, falls notwendig)
	1-5 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 µl	dH ₂ O

Ansatz für präparativen Verdau:	5 µg	DNA
	5 µl	10x Puffer geeigneter Ionenstärke
	(5 µl	10% BSA, falls notwendig)
	10-20 U	Restriktionsendonuklease
	ad 50 µl	dH ₂ O

3.1.6 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Die Behandlung der mit Restriktionsendonukleasen verdauten Plasmid-DNA mit einer alkalischen Phosphatase aus Garnelen (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*) dient der Entfernung der 5'-Phosphatgruppen durch Hydrolyse. So kann eine Religation der linearisierten Plasmide verhindert werden.

Ansatz	(0,5 µg/µl)	Vektor-DNA nach präparativem Restriktionsendonukleaseverdau (3.1.5)
	5 µl	10x SAP-Puffer
	6 µl	SAP (1 U/µl)
	ad 50 µl	dH ₂ O

Der Ansatz wird zunächst mit 5 µl SAP 1h bei 37°C, nach Zugabe von 1 µl SAP 30 min bei 52 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt für 20 min bei 72 °C. Die DNA wird anschließend mit dem *QIAquick™ PCR Purification Kit* (3.1.2) gereinigt und in 50 µl dH₂O eluiert.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

DNA-Ligasen katalysieren die Formierung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe eines mit der freien 3'-OH-Gruppe eines zweiten DNA-Doppelstranges. Ein über PCR (3.1.1) und Verdau mit Restriktionsendonukleasen (3.1.5) erhaltenes Insert kann so in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (3.1.6, 3.1.7) ligiert werden.

Ansatz:	100 – 200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA
	25 – 50 ng	verdaute, gereinigte, SAP-behandelte Vektor-DNA
	1,5 µl	10x Ligationspuffer mit 10 mM ATP
	1,5 µl	T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
	ad 15 µl	dH ₂ O

Die Ansätze der Ligation werden für eine Stunde bei RT oder für 16 h bei 14 °C inkubiert und im Anschluss daran vollständig in Z-kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) transformiert.

3.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfordert deren Einbringung in Bakterienzellen. Damit Bakterienzellen fremde Plasmid-DNA aufnehmen können, müssen sie zuerst kompetent gemacht d.h. zur Aufnahme von DNA befähigt werden. Dies kann mithilfe des *Z-Competent E.coli Transformation Kit™ and Buffer Sets* erreicht werden. Die Bakterien werden entsprechend des beiliegenden Protokolls behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Z-kompetenten *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) werden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem 100 µl Bakteriensuspension zur DNA-Lösung (z.B. 15 µl Ligationsansatz oder 20 ng Plasmid- DNA) hinzugegeben werden und dieser Ansatz für eine 20 min auf Eis inkubiert wird.

3.1.9 Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien

Um Bakterienzellen, die transformiert wurden und damit Plasmid-DNA aufgenommen haben (3.1.8), von nicht transformierten Bakterienzellen unterscheiden zu können, tragen Plasmide, die als Vektoren genutzt werden, zur Selektion ein Antibiotika-Resistenzgen. Wenn transformierte Bakterien auf LB-Agarplatten, die ein Antibiotikum (hier Ampicillin mit der c = 100 µg/ml) enthalten, ausplattiert und 16 h bei 37 °C inkubiert werden, können nur diejenigen Bakterien Kolonien ausbilden, die durch Transformation den Vektor mit dem entsprechenden Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen haben.

3.1.10 Präparation der Agarplatten

Für die Herstellung von antibiotikahaltigen LB-Agarplatten wird autoklaviertes und bei RT gelagertes LB-Medium erhitzt und nach Abkühlung auf ca. 50 °C mit Antibiotika (Ampicillin = 100 µg/ml oder Kanamycin = 25 µg/ml) versetzt. Mit dem noch flüssigen Agar werden Petrischalen befüllt und diese nach Aushärtung bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (kleiner Maßstab)

Plasmidpräparationen kleinen Maßstabs dienen der Isolierung rekombinanter Plasmide aus Bakterien und deren späterer Charakterisierung. Dafür werden einzelne Bakterienkolonien in 5 ml LB-Medium versetzt mit Ampicillin ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) aufgenommen und 16 h auf einem Schüttler bei 200 UpM und 37 °C inkubiert. Mithilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* werden 1,5 ml dieser Bakteriensuspension zur Präparation der Plasmid-DNA entsprechend des Arbeitsprotokolls verwendet. Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Bindung der Plasmid-DNA an die in der Säule enthaltene Silicamembran. Durch wiederholtes Waschen wird die Plasmid-DNA von Verunreinigungen befreit und nach dem Trocknen der Säule in 50 μl dH₂O eluiert. Zur Analyse der gewonnenen DNA wird ein Restriktionsverdau (3.1.5) mit ca. 5 μl Eluat durchgeführt, welcher anschließend auf einem analytischen Agarosegel visualisiert wird (3.1.3.1).

3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (großer Maßstab)

Eine Plasmidpräparation großen Maßstabs erfolgt unter Verwendung des *HiSpeed® Plasmid Maxi Kits*, dessen Durchführung nach der Anleitung des Herstellers erfolgt. Zur Anzucht des gewünschten Bakterienklons werden 100 μl einer Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium versetzt mit Ampicillin ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) inokuliert und bei 37 °C 16 h schüttelnd inkubiert. Das Prinzip der Plasmid-Isolierung entspricht dem der DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Bakterien werden pelletiert, alkalisch lysiert, das Lysat neutralisiert, die Plasmide an die Anionenaustauscher-Matrix der *QIAGEN*-Tips gebunden und die Plasmid-DNA mit 500 μl dH₂O eluiert). Die quantitative und qualitative Untersuchung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem Photometer (*GeneQuant pro* oder *Nanodrop® ND1000*) (3.1.13). Anschließend kann die DNA-Präparation durch Sequenzierung (3.1.14) des Plasmids überprüft werden.

3.1.13 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Ringstrukturen der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA in wässriger Lösung haben die Eigenschaft UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 260 \text{ nm}$ zu absorbieren (Lambert-Beersches Gesetz). Mit dem Spektralphotometer *Nanodrop® ND1000* kann die Extinktion E gemessen werden, die dem negativen Logarithmus der

Transmission T entspricht, wobei die Transmission der Quotient aus einfallender Lichtintensität I_0 und durchdringender Lichtintensität I ist.

Eine Aussage über die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen erlaubt der Quotient OD_{260}/OD_{280} , (hierbei ist 280nm das Absorptionsmaximum von Proteinen, welche die DNA potentiell verunreinigen können). Reine Lösungen sind durch Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 charakterisiert. Verunreinigungen durch Proteine ergeben einen Wert kleiner als 1,8; Kontaminationen durch Phenol oder RNA hingegen ergeben deutlich höhere Quotienten.

3.1.14 DNA- Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger and Coulson 1975). Bei der hier verwendeten Modifikation der Methode wird die zu sequenzierende DNA durch PCR amplifiziert. Neben den Desoxynukleosid-triphosphaten (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP und dGTP befinden sich im Reaktionsgemisch geringe Konzentrationen der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosid-triphosphate (ddNTPs) ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP. Während der DNA-Synthese kommt es durch den Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, da die ddNTPs nicht die für die 5'-3'-Phosphodiesterbindung notwendige 3'-OH-Gruppe besitzen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen und deren letztes Nukleotid am 3'-Ende immer ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP ist. Nach der Aufreinigung werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Länge nach über eine Harnstoff-Polyacrylamidgel-Säule aufgetrennt, wobei ein Argon-Laser die Fluoreszenz des jeweiligen Fragments durch Abtasten des unteren Gelrandes detektiert. Zur Analyse der zu sequenzierenden DNA werden die Proben an die Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH gesendet, wobei die DNA-Proben wie folgt vorbereitet werden.

Ansatz:	200 – 600 ng	gereinigte Plasmid-DNA
	20 pmol	Primer
	ad 7 µl	dH ₂ O

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von HEK293- und HUH7- Zellen

Bei den verwendeten humanen Hepatomazellen (HUH-7) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) handelt es sich um permanente Zelllinien, die in 75cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert werden. Als Wachstumsmedium wird *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM +++) versetzt mit 10 % Fötalem Kälber Serum (FCS), L-Glutamin (Q) und Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Passage der Zelllinien findet alle 3 bis 4 Tage unter einer Sicherheitswerkbank statt, wobei die zur Passage verwendeten Medien und Substanzen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden müssen. Der konfluente Zellrasen wird nach Dekantieren des Zellkulturmediums zwei Mal mit PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wird durch Zugabe von 8 ml DMEM(+++) die Reaktion abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.

Wenn 293HEK-Zellen zur Produktion und Analyse von infektiösen virusähnlichen Partikeln (iVLPs) genutzt werden und damit 72 h bei 37 °C inkubiert werden sollen, werden Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin (c = 0.1 mg/ml) für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, danach zwei Mal gründlich mit PBS_{def} gewaschen und die Zellen darauf ausgesät. Durch die Beschichtung mit Poly-D-Lysin können 293HEK-Zellen, die sich üblicherweise leicht vom Boden z.B. von Zellkulturflaschen ablösen, sich besser an den Boden der Zellkulturschalen anheften.

3.2.2 Transiente DNA-Transfektion mit *TransIT*

Um DNA in Zellen einzubringen, wird die negative Ladung des Phosphatrückgrats durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden (beinhaltet in *TransIT*) maskiert. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern und diese passieren, so dass eine Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen ermöglicht wird.

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so umgesetzt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50 bis 70 % aufweisen (3.2.1). Soll eine Immunfluoreszenzanalyse (3.3.2) durchgeführt werden, müssen die Zellen auf Deckgläschen Ø 12 mm) ausgesät werden. Die Transfektionsansätze werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers von *TransIT* angesetzt.

Pro well einer 6 well- Platte:	Ansatz I	3 µl	<i>TransIT</i> / 1 µg Plasmid-DNA
		100 µl	Opti-MEM®
	Ansatz II	x µg	DNA
		100 µl	Opti-MEM®

Die Ansätze I und II werden zunächst getrennt 5 min bei RT inkubiert, miteinander vereint, dabei gründlich gemischt und erneut für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und diese einmal mit auf 37 °C vorgewärmten DMEM(+Q) gewaschen. Anschließend werden pro well einer 6 well-Zellkulturplatte 2 ml warmes DMEM(+Q) vorgelegt, denen dann nach Ablauf der Inkubationszeit 200µl des Transfektionsansatzes zugesetzt werden. Die Transfektion erfolgt anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37 °C, nach denen die Transfektion der Zellen weitgehend abgeschlossen sein sollte, kann ein Mediumwechsel zu DMEM(+++) stattfinden.

3.2.3 Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot

Damit Zellen mit Hilfe eines Western Blots analysiert werden können, werden die Zellen 24 h – 72 h p.t. einmal mit PBS_{def} gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgt nach Zugabe von 1 ml PBS_{def} pro well einer 6 well-Zellkulturschale und Abkratzen mit Hilfe eines Zellschabers. Die aufgenommenen Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und 2 min bei 5000 UpM (800xg) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 1x *Passive Lysis Buffer* lysiert (3.2.3), nochmals 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert und mit 4x Proteinprobenpuffer versetzt. Anschließend werden die Proben 5 min bei 95 °C aufgekocht und dann auf eine SDS-PAGE (3.3.1.1) aufgetragen und durch einen Western Blot (3.3.1.2) analysiert werden.

3.2.4 Untersuchung der Abbaukinetik von Proteinen mittels Cycloheximid

Um die Stabilität von Proteinen und deren Abbau in Zellen zu untersuchen kann man die Proteinbiosynthese unterbinden, um eine Ausgangsproteinmenge zu definieren

und zu verhindern, dass durch unterschiedliche Geschwindigkeiten bei der Proteinsynthese die Ausgangsmengen verändert werden.

Ein Stoff, der zur Unterbindung der Proteinbiosynthese genommen werden kann, ist das Antibiotikum Cycloheximid, welches die Peptidyltransferase an der 60S-Untereinheit des Ribosoms hemmt und so die Translation verhindert.

Die für die zu untersuchenden Proteine kodierenden Plasmide werden mit TransIT in HEK293-Zellen transfiziert, nach 17h wird das Zellmedium durch 100µg/ml Cycloheximid enthaltendes DMEM ausgetauscht. Nun werden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert (3.2.3) um Informationen über die Abbaukinetik zu erhalten (t=0h, t=2h, t=4h, t=6h, t=8h). Die Zelllysate werden mit SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2) auf den verbleibenden Gehalt an dem zu untersuchendem Protein analysiert.

3.2.5 Infektiöser EBOV VLP-Assay

Bei diesem infektiösen VLP-Assay werden Virus-ähnliche Partikel generiert, die statt der genomischen EBOV-spezifischen RNA eine artifizielle Minigenom-RNA enthalten. Diese enthält die für die Transkription und Replikation notwendigen Leader- und Trailer-Regionen des EBOV-Genoms und ein Reportergen in negativer Orientierung, das den Transkriptions- und Replikationsnachweis unter BSL1-Bedingungen ermöglicht.

HEK293-Zellen werden mittels *TransIT* mit folgenden Plasmiden transfiziert (p0) (3.2.2):

Plasmid	Menge	Promotor
1) pCAGGS- VP40	250 ng	β-chicken actin
2) pCAGGS- VP24	30 ng	β-chicken actin
3) pCAGGS- VP30	100 ng	β-chicken actin
4) pCAGGS- VP35	125 ng	β-chicken actin
5) pCAGGS- L	1000 ng	β-chicken actin
6) pCAGGS- NP	125 ng	β-chicken actin
7) 3E-5E-Luc	250 ng	T7
8) pCAGGS- T7-Polymerase	250 ng	β-chicken actin
9) pGL4	100 ng	SV40
10) pCAGGS- GP (wt oder Mutanten)	250 ng	β-chicken actin

Die Aufreinigung der iVLPs, der Nachweis der Ebolavirus-spezifischen Transkription und die Infektion von HUH7-Zellen (p1) werden durchgeführt wie unter 3.2.5.1 bis 3.2.5.4 beschrieben

3.2.5.1 Aufreinigung der iVLPs

Hierzu wird der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen und, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, bei 4 °C und 2500 UpM (971x g) 10 min zentrifugiert.

In *UltraClear™* Zentrifugenröhrchen für SW41 Ultrazentrifugen-Rotoren werden 2 ml (1 ml) einer 20 %igen Sucrose-Lösung (gelöst in TNE-Puffer) vorgelegt und vorsichtig mit dem zuvor zentrifugierten Zellkulturüberstand überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen werden mit PBS_{def} aufgefüllt, austariert und in der Ultrazentrifuge für zwei Stunden bei 4 °C und 36.000 UpM (164.000xg) in einem SW41-Rotor zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert, die Röhrchen vorsichtig trocken gewischt und das Pellet je nach Fragestellung resuspendiert in 150µl DMEM(+Q).

3.2.5.2 Proteinase K-Verdau der iVLPs

Virale Proteine, welche durch die virale Membran umschlossen werden (z.B. Nukleocapsid-proteine oder VP40), sind vor dem Abbau durch Proteinasen (wie die hier verwendete Proteinase K) geschützt, wohingegen Oberflächenproteine wie das GP durch Proteinasen verdaut werden. Permeabilisierung der Membranen mittels Behandlung mit dem Detergenz TritonX-100, führt zum Abbau aller viralen Proteine und dient als Aktivitätsnachweis der Proteinase K. Mit dieser Methode kann also die Integration viraler Proteine in iVLPs untersucht werden, die Vorgehensweise ist dabei wie folgt:

- | | | | | |
|----|-------|----|-----------------------------|--|
| 1) | 20 | µl | + 4,6 µl PBS _{def} | |
| | iVLPs | | | |
| 2) | 20 | µl | + 2,2 µl PBS | + 2,4 µl Proteinase K |
| | iVLPs | | | (1:40 in PBS _{def} [entspricht 0,025U]) |
| 3) | 20 | µl | + 2,2 µl PBS/ | + 2,4 µl Proteinase K |
| | iVLPs | | 1% TritonX-100 | (1:40 in PBS _{def} [entspricht 0,025U]) |

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wird die Proteinase K durch Zugabe von 1 µl PMSF (c = 100 mM) für 5 min bei RT inaktiviert. Die Ansätze werden mit 8 µl 4x Proteinprobenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und die Proben mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und anschließendem Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert.

3.2.5.3 Nachweis der EBOV-spezifischen Transkription in Passage 0

Damit transfizierte HEK293-Zellen bezüglich EBOV-spezifischer Transkription untersucht werden können, werden diese 72 h p.t. einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 1 ml PBS_{def} abgelöst und bei 4.000 UpM für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 200 µl 1x *Passiv Lysis Buffer* von *Promega* resuspendiert und für 20 min bei RT schüttelnd aufgeschlossen. Die Lysate werden anschließend zentrifugiert (13.000 UpM (15.700xg), 4 °C, 5 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Luciferaseaktivität wurde dann entweder mit dem *Dual-Luciferase® Reporter-Assay* von *Promega* oder mit *Beetle-Juice* und *Renilla-Juice* von *pjk* gemessen. Die Messung erfolgt in einem Luminometer nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Mit Hilfe dieser Systeme ist es möglich die Aktivität des Reporters, der Renilla Luziferase zu messen, welche ein Maß für die Marburgvirus-spezifische Transkription darstellt. Zusätzlich kann die Aktivität der Firefly Luziferase (pGL4) gemessen werden, welche ein Maß für die zelluläre Transkription darstellt und der Kontrolle und Normalisierung der Zelllysate dient.

3.2.5.4 Infektion von HUH7-Zellen in Passage 1

Die zu infizierenden HUH7-Zellen werden einen Tag vor der Transfektion ausgesät (40-50 % Konfluenz). Für die Infektion werden sie 1x mit DMEM(+Q) gewaschen, die resuspendierten iVLPs hinzugegeben und bei 37 °C für 1,5 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2 ml DMEM(+Q) und 1 ml DMEM (+++) pro Ansatz und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 65 Stunden.

Für die Zellernte (p1) werden diese einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 1 ml PBS_{def} abgelöst, 5 min bei 4.000 UpM abzentrifugiert und schließlich in 150 µl 1x *Renilla Lysis Buffer* des *Renilla Luciferase Assay Systems* resuspendiert. Die Zelllyse erfolgt bei RT während einer Inkubation von 20 min auf dem Schüttler. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 UpM [15.700xg], 4 °C, 5 min) wird der Überstand in das *Renilla Luciferase Assay System* nach Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich die Aktivität des Reporters, der Renilla Luziferase zu

ermitteln, welche ein Maß für die Marburgvirus-spezifische Transkription in den HUH7-Zellen anzeigt und somit auch einen Nachweis für die Infektion der Zellen durch die rekombinanten iVLPs liefert.

3.2.6 Aufreinigung von NP-Helices

Um NP-Helices elektronenmikroskopisch darstellen zu können, müssen diese vorher mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt werden. Hierfür werden je eine 10cm²-Platte HEK293-Zellen mittels TransIT mit dem jeweiligen Plasmid transfiziert. Nach 72h Inkubation wird der Überstand dekantiert und die Zellen in 1 ml PBS+ aufgenommen. Anschließend werden sie bei 2500UpM abzentrifugiert und dann in einem Lysepuffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wird das Zelllysate noch mal bei 17.000 UpM für 10 min zentrifugiert. Anschließend kann der Überstand vorsichtig auf einen Calciumchlorid-Gradienten (20%-40% CaCl) geladen werden. In *UltraClear*TM-Zentrifugenröhrchen für SW60-Rotoren werden je 800 µl 40 %, 30%, 20% CaCl übereinander geschichtet und mit dem Überstand des Zelllysates überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt bei 52.000 UpM und 15°C für eine Stunde. Danach wird eine makroskopisch sichtbare Bande mit der Pipette aufgenommen und in ein *Microfuge*[®] Tube *Polyallomer* TLA45-Röhrchen überführt. Es folgt eine weitere Ankonzentration der Partikel durch einen abschließenden Ultrazentrifugationsschritt in einem TLA45-Rotor bei 45.000 UpM für 30 min bei 12 °C. Anschließend konnten per SDS-Page (3.3.1.1) und Western-Blot (3.3.1.2) analysiert oder für die Elektronenmikroskopie (3.3.3) weiterverarbeitet werden.

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung

3.3.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Proteine werden dabei mit SDS (Natriumdodecylsulfat) komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer Molekülgröße auf. Dabei zeigen kleine Proteine ein schnelleres Laufverhalten im Gel

als Größe. Das Gel besteht aus einem 4%igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigem Trenngel. In der vorliegenden Arbeit wird, wenn nicht anders angegeben, ein 10%iges Trenngel verwendet.

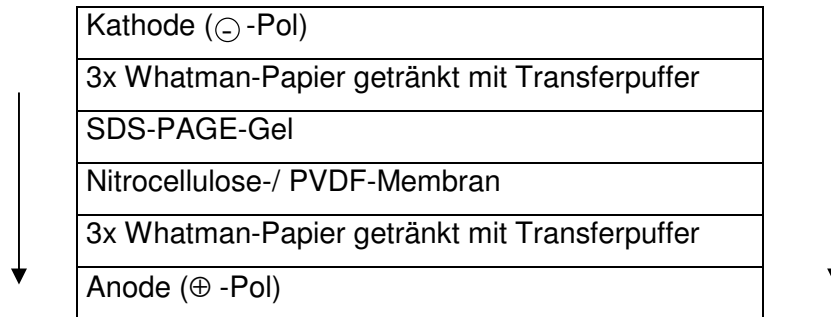
	Sammelgel 4%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
dH ₂ O	1,4 ml	1,9 ml	1,6 ml
30% Polyacrylamid- Lösung (Rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	1,7 ml	2 ml
PAGE- Sammelgelpuffer	0,27 ml	-	-
PAGE- Trenngelpuffer	-	1,35 ml	1,35 ml
10 % APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,112 ml

Da alle Proteine beim Eintritt in das höherprozentige Trenngel zunächst in ihrem Laufverhalten verlangsamt werden, ist die Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach gewährleistet. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, wird ihnen eine entsprechende Menge 4x Proteinprobenpuffer zugesetzt, die Proben bei 95 °C für 5min inkubiert und damit die Proteine denaturiert. Neben den Proben wird ein Größenmarker aufgetragen, der die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine ermöglicht. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Biorad®-Minigelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei 20 mA pro Gel und maximaler Spannung. Anschließend erfolgt zur Analyse der Proben ein Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3).

3.3.1.2 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot stellt mit einer Nachweisgrenze von 1 pg Protein eine empfindliche Nachweismethode für Proteine dar. Dafür werden diese zunächst mittels SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt (3.3.1.1) und anschließend während der Transferierung auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran irreversibel gebunden, so dass die Proteine immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich werden. Zur Durchführung eines Western Blots nach dem Semi-Dry-Blot-Prinzip werden sowohl die Nitrocellulose- oder PVDF-Membran als auch pro Western Blot sechs Blätter Whatman-Papier (6x8 cm) mit Transfer-puffer benetzt. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer in 100 % Methanol eingelegt und anschließend zur Entfernung des

Methanols mit Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran muss lediglich mit Transferpuffer benetzt werden und darf nicht in Methanol eingelegt werden. Der Western Blot zeigt in einer *Biorad*-Apparatur folgenden Aufbau:



Durch Überrollen mit einer Plastikpipette werden Luftblasen entfernt, um einen vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgt für 40 min bei 20 V und maximaler Stromstärke.

3.3.1.3 Antikörperfärbung des Western Blot und Detektion des Antikörpers

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C in PBS_{def} versetzt mit 10 % Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss wird die Membran 3x10 min mit PBS_{def} gewaschen und für 1h bei RT mit einem proteinspezifischen Erstantikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 min in PBS_{def}/ 0,1%Tween20 entfernt. Im nächsten Schritt wird die Membran entweder eine Stunde bei RT unter Schwenken mit einem geeigneten Peroxidase (POD/HRP)-gekoppelten Zweit-antikörper oder lediglich für 45 min mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper im Dunkeln inkubiert. Abschließend folgen 3x10 min Waschen mit PBS_{def}/ 0.1%Tween20.

Die Detektion der POD-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt mit Hilfe von Chemilumineszenz. Dazu wird die Membran auf Folie gelegt, zu gleichen Teilen *SuperSignal® West Dura Peroxide Buffer*, bei sehr schwachen Signalen *SuperSignal® West Femto Peroxide Buffer* und *Luminol/ Enhancer-Solution* gemischt, auf der Membran verteilt und diese mit einer zweiten Folie bedeckt. Nach einer 5minütigen Inkubation wird die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in der Dunkelkammer je nach Signalstärke auf einem Röntgenfilm exponiert; anschließend

findet die Entwicklung des Röntgenfilms mit Hilfe der automatischen Entwicklerrmaschine *Optimax 2010* statt.

Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt direkt durch Messung der Fluoreszenz mit dem *LiCor Odyssey Infrared Imaging System*. Dieses Gerät enthält zwei Laser, die mit einer Wellenlänge von 680 nm und 800 nm dazu in der Lage sind, zwei Fluorophore bei ihrem Absorptionsmaximum von 680 nm (*Alexa Fluor[®] 680*) und 800 nm (*IRDye[™] 800*) gleichzeitig anzuregen.

Folgende Antikörperverdünnungen wurden in den Western Blot-Analysen verwendet:

Erstantikörper	Verdünnung
α -c-myc monoklonal, Maus	1:500
α - flag [™] M2, monoklonal, Maus	1:100
α - flag [™] BioM2, monoklonal, Maus	1:500
α -EBOV GP/NP Serum, Ziege	1:30000
α -VP40 Serum, Meerschweinchen	1:1000

Zweitantikörper	Verdünnung
Ziege α -Maus, IRDye800	1:10.000
Esel α -Maus, <i>AlexaFluor[®] 680</i> -gekoppelt (H+L)	1:10.000
Esel α -Ziege <i>AlexaFluor[®] 680</i> -gekoppelt (H+L)	1:10.000
Ziege α -Meerschweinchen, IRDye 800	1:10.000
Esel α -Ziege, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	1:30.000

3.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zur Untersuchung der intrazellulären oder oberflächlichen Lokalisation von Proteinen bedient man sich der indirekten Immunfluoreszenzanalyse. Das Prinzip beruht auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen: Der Erstantikörper erkennt und bindet das Zielprotein in der Zelle; der Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper gerichtet und durch einen Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Dieser wird durch das UV-Licht des Fluoreszenzmikroskops angeregt, wodurch die Lokalisation des Proteins angezeigt wird.

Für Immunfluoreszenzanalysen werden HUH7-Zellen auf runden Deckgläsern (\varnothing 12 mm) in 6 well-Zellkulturplatten kultiviert (40-50 % Konfluenz) und mittels *TransIT* (3.2.2) mit Plasmiden transfiziert, die für die gewünschten Proteine codieren. Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank, werden die Zellen auf den Deckgläsern 3x mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mindestens 15 min in DMEM/ 4% PFA fixiert. Die Fixierungslösung wird durch 2x min Waschen mit PBS_{def}

entfernt. Zur Neutralisation der Aldehydgruppen des Paraformaldehyds werden die Zellen 10 min mit 100 mM Glycin/PBS_{def} inkubiert und schließlich zur Permeabilisierung der Zellmembranen 7 min mit 0.1 % Triton-X100/PBS_{def} behandelt. Die Zellen werden erneut mit PBS_{def} gewaschen und 10 min mit Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzen inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden mit dem ersten antigenspezifischen Antikörper für eine Stunde in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert, wofür 25 µl des verdünnten Antikörpers auf Parafilm gegeben und die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite darauf gelegt werden. Anschließend werden die Deckgläser 3x5 min mit PBS_{def} gewaschen und für 1 Stunde mit 25 µl des verdünnten Zweitantikörpers und DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Anfärbung der Zellkerne), wie oben beschrieben, inkubiert. Der Zweitantikörper ist gekoppelt mit einem Fluoreszenz-farbstoff und spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS_{def} werden die Deckgläser kurz in dH₂O getaucht und mit der zell-bewachsenen Seite nach unten mittels *Fluoprep (+DABCO)* auf einem Objektträger eingedeckt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (*Axiovert 200M*) untersucht werden.

Erstantikörper	Verdünnung
Maus α-flag M2 monoklonal	1:150
Kaninchen α-myc monoklonal	1:50
Ziege α-GFP polyklonal	1:500
Zweitantikörper	Verdünnung
Esel α-Maus Texas Red	1:100
Esel α-Kaninchen FITC	1:100
Esel α-Ziege Rhodamin	1:100
DAPI	1:10.000

3.3.3 Indirekte Immunelektronenmikroskopie

Um die Morphologie der NP Helices mit dem Elektronenmikroskop analysieren zu können, müssen Nickelgrids entsprechend vorbereitet werden. Zuerst werden diese mit einer Schicht aus 3 %igem Formvar in Chloroform und danach mit einer Schicht Kohlenstoff beschichtet, anschließend werden 20µl der vorbereiteten NP-Helices (3.2.5) aufgebracht und je nach Konzentration 5 min bis 12 h darauf belassen.

Während dieser Inkubationszeit findet die Anheftung über die Membranen der VLPs an die Oberfläche der Nickelgrids statt; diese Anheftung kann durch eine einminütige Vorinkubation der Nickelgrids mit 1 % AlcyanBlue verbessert werden. Die überschüssige Flüssigkeit wird vorsichtig vom Rand her mit Filterpapier abgesaugt. Durch eine 10minütige Inkubation der Grids mit dem Blockierungspuffer für Immunelektronenmikroskopie in einer feuchten Kammer, werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Es folgt die Inkubation mit dem Erstantikörper (α MARV GP [50-6-10], 1:50 in Blockierungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Im Anschluss werden die Grids 6x2 min mit PBS_{def} gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper (Ziege α Maus IgG gekoppelt mit 5 nm-Goldpartikeln, 1:30 in Blockierungspuffer) für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen der Grids für 6x2 min mit PBS_{def}, erfolgt die Fixierung der Bindung zwischen dem Protein, Erst- und Zweitantikörper durch zehnminütiges Auflegen der Grids in 0.25 % Glutaraldehyd/ PBS_{def}. Nach zweimaligem Waschen für zwei Minuten in PBS_{def}, erfolgt die Kontrastierung mit 2 % Phosphorwolframsäure (gelöst in dH₂O, pH 7.2) für höchstens zwei Minuten. Anschließend werden die fertig behandelten Grids mit der iVLP-tragenden Seite nach oben auf ein Filterpapier gelegt, wodurch die überschüssige Phosphorwolframsäure abgesaugt wird und bis zur Betrachtung im Elektronenmikroskop in Glas-Petrischalen aufbewahrt.

3.3.4 Koimmunpräzipitation mit α -flag M2-Agarose

Koimmunpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis eines Proteins oder einer Proteininteraktion. Hierbei werden Proteine mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Komplexen an große Moleküle wie Agarose (oder A-Sepharose) gekoppelt und ausgefällt. Kommerziell erhältlich sind Agarosen mit kovalent gebundenen Antikörpern gegen myc oder flag, letztere wurde auch in der vorliegenden Arbeit benutzt. Mit dieser kann man also flag-Epitop enthaltende Proteine fällen und nachweisen, interagierende Proteine werden dabei ebenfalls sedimentiert.

Für die Koimmunpräzipitation werden HEK293-Zellen mittels TransIT mit den erforderlichen Plasmiden transfiziert und 48h inkubiert. Anschließend werden sie einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und bei 5000 UpM 2 min abzentrifugiert. Nun wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml mit *Complete*-Proteinase-Inhibitor-Cocktail (*Roche*) komplettiertem KoIP-Puffer aufgenommen. Dann werden die Zellen 1 min sonifiziert und danach 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellreste nochmals bei 13.000 UpM zentrifugiert und

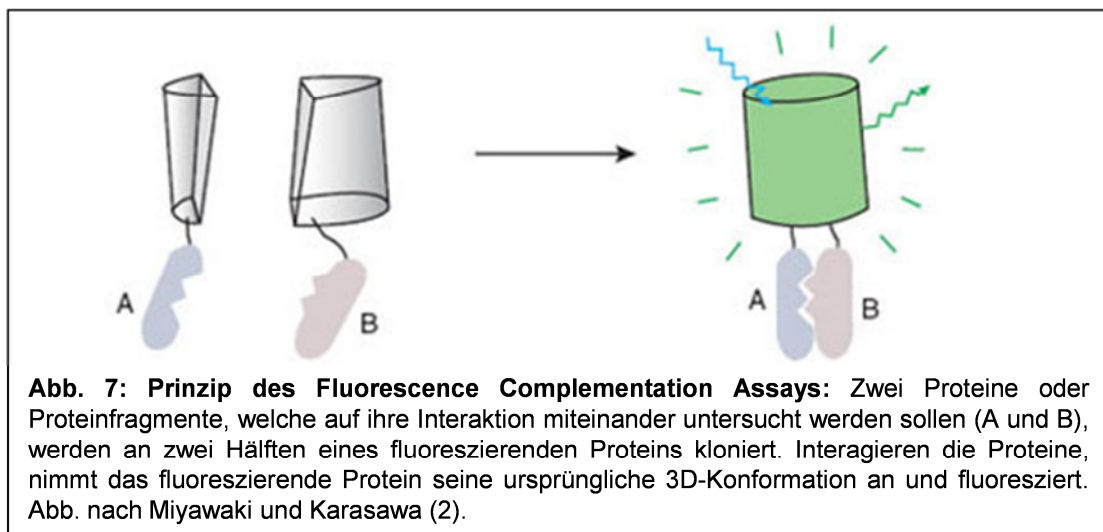
anschließend der Überstand aufgeteilt: 45 µl werden zur Expressionskontrolle verwendet, die Restlichen 400 µl mit flag-Agarose inkubiert.

Pro Ansatz werden 35 µl α -flag M2-Agarose in Ethanol (*Sigma*) in 200 µl KoIP-Puffer aufgenommen, dreimal bei 3.000 rpm (800x g) und 4°C mit KoIP-Puffer gewaschen und anschließend in 35 µl KoIP-Puffer aufgenommen.

Lysat und Agarose inkubieren 3h bei 4°C auf dem ÜKR. Anschließend wird die Agarose inklusive der gebundenen Proteine eine Minute bei 3000 rpm (800 g) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit je 800 µl KoIP-Puffer wird das Immunpräzipitat in 45 µl 4x Probenpuffer aufgenommen. Zu den Expressionskontrollen werden je 15 µl 4x Probenpuffer gegeben und alle Proben für 5 min bei 95°C inkubiert. Dies führt zur Ablösung der präzipitierten Proteine von der Agarose. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgt mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und anschließendem Western Blot (3.3.1.2).

3.3.5 Fluorescence Complementation Assay

Ein Fluorescence Complementation Assay bietet die Möglichkeit, Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen. Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 6 dargestellt und besteht darin, dass ein selbst-fluoreszierendes Reporterprotein in zwei Teile gespalten wird, welche nicht funktionell sind und sich nicht spontan falten und daher keine Fluoreszenz emittieren. Diese Fragmente werden mit je einem Protein oder Proteinfragment fusioniert, welches man untersuchen hinsichtlich seiner Interaktionsfähigkeit untersuchen möchte.



Wenn eine Interaktion zwischen den beiden untersuchten Hybriden besteht, bringt diese die beiden Reporterproteinfragmente in direkte Nachbarschaft, so dass deren strukturelle Konformation zu der des fluoreszierenden Proteins komplettiert wird. Die emittierte Fluoreszenz kann unter Anregung am Fluoreszenzmikroskop beobachtet oder quantifiziert werden und dient als Maß für die Interaktion

4. Ergebnisse

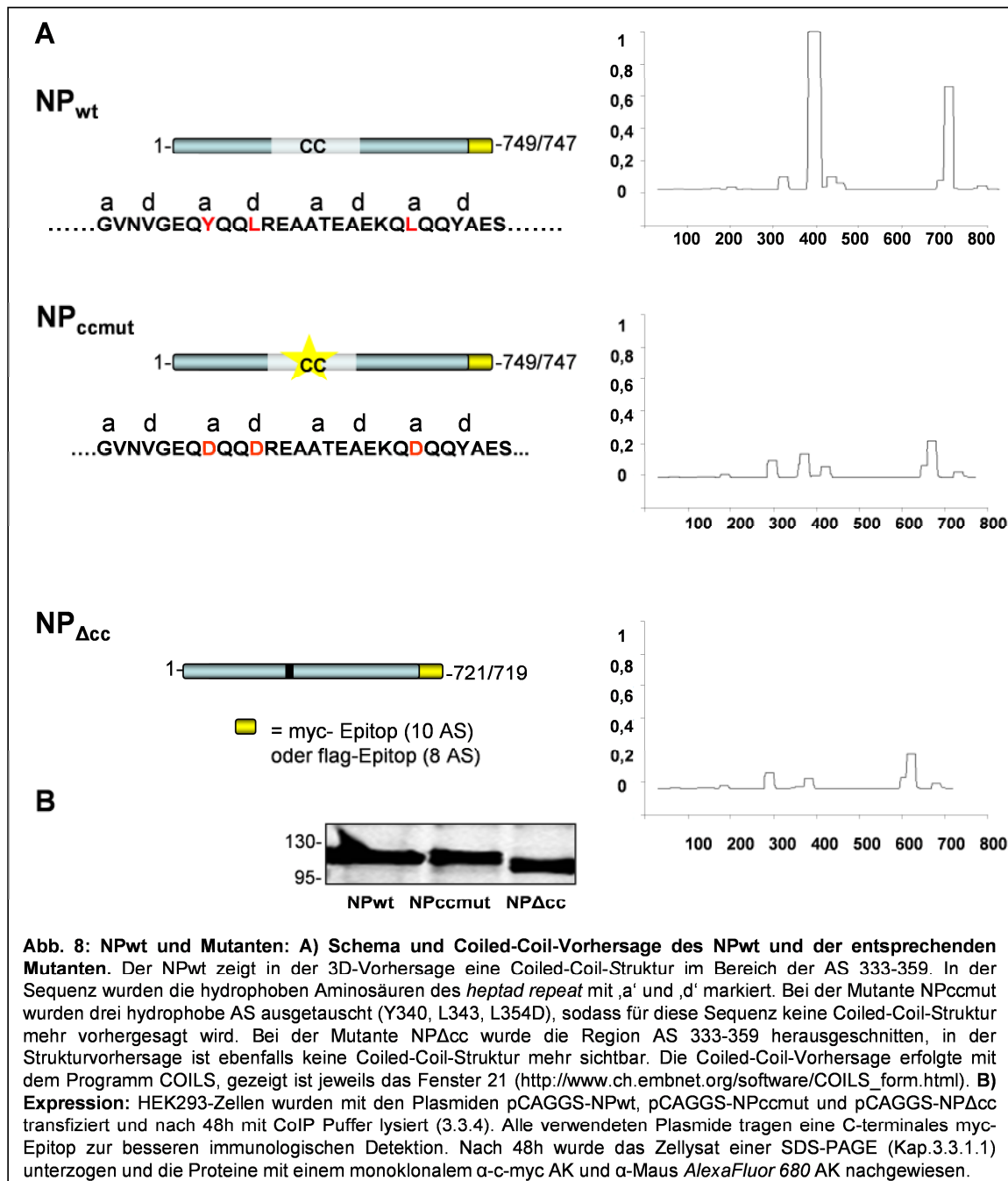
4.1 Herstellung von Mutanten zur Untersuchung der Coiled-Coil-Domäne des NP

Der Nucleokapsidkomplex der Filoviren besteht aus dem Nucleokapsidprotein NP, der Polymerase L, dem Polymerase-Kofaktor VP35, dem Transkriptionsaktivator VP30 und der viralen RNA. Das NP stellt die Hauptkomponente des Nucleokapsidkomplexes dar und ermöglicht durch die Enkapsidierung der RNA deren Erkennung durch die Polymerase (Templatefunktion). NP ist daher essentiell für Transkription und Replikation (Elliott, Kiley et al. 1985; Muhlberger, Weik et al. 1999). Für das MARV konnte gezeigt werden, dass zwei Coiled-Coil-Domänen innerhalb des NP eine wichtige Rolle für die Homooligomerisierung des NP, die Interaktion mit VP35 und die virale Transkription spielen (DiCarlo, Möller et al. 2007). Für das EBOV-NP kann man anhand der *in silico* Strukturvorhersage ebenfalls von einer Coiled-Coil-Struktur im Bereich der AS 333-359 ausgehen (Abb. 8). Im Folgenden soll die Bedeutung der vorhergesagten Coiled-Coil-Domäne des EBOV-NP näher untersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurden zwei Mutanten des EBOV-NP benutzt, die in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren (zur Verfügung gestellt von N. Biedenkopf). Zum einen handelt es sich um eine Mutante, bei der durch Punktmutationen wesentliche, für die Struktur der Coiled-Coil-Domäne essentielle Aminosäuren ausgetauscht wurden, so dass die Wahrscheinlichkeit für die Bildung einer Coiled-Coil in der Strukturvorhersage deutlich abnahm. Es wurden die hydrophoben AS an den Stellen 340 (Tyrosin), 343 und 354 (Leucin) zur negativ geladenen Asparaginsäure mutiert (Abb. 8A). Die ausgetauschten Aminosäuren nahmen jeweils Position ‚a‘ oder ‚d‘ im *heptad repeat* ein und vermittelten damit die 3D-Struktur der Coiled-Coil. Das mutierte NP hatte nur noch ca. 20% Wahrscheinlichkeit, eine Coiled-Coil-3D-Struktur zu bilden. Diese Mutante wird im Folgenden NP_{ccmut} (= mutierte Coiled-Coil-Sequenz) genannt.

Des Weiteren wurde bei einer anderen Mutante die Coiled-Coil entfernt, die Region AS 333-359 wurde also komplett deletiert. Für diese Mutante war die Wahrscheinlichkeit, eine Coiled-Coil zu bilden unter 20% (s. Abb. 8). Diese Mutante wird im Folgenden NP_{Δcc} (=deletierte Coiled-Coil) genannt.

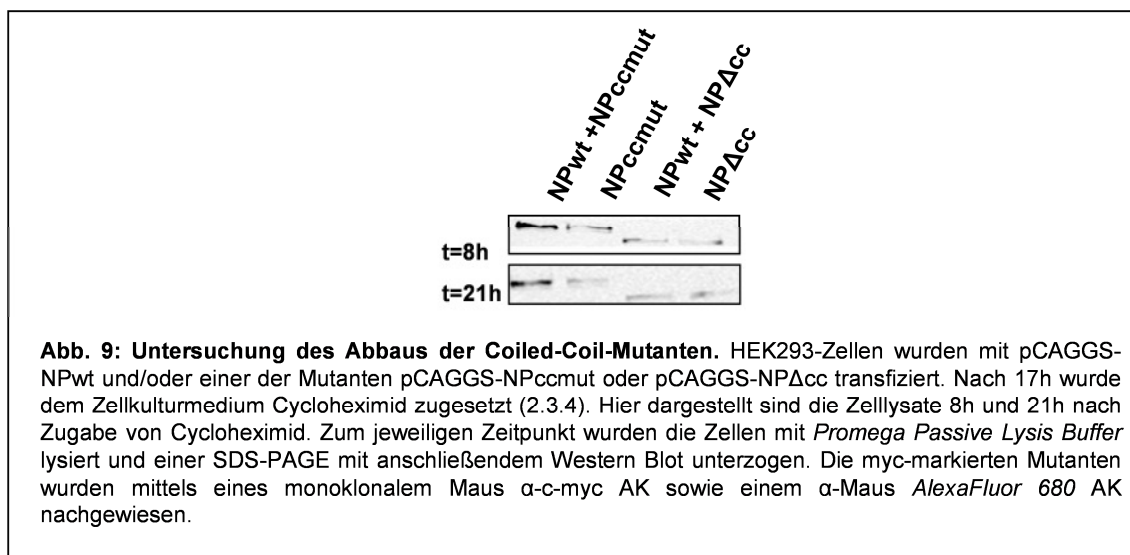
Die NP-Mutanten wurden plasmidgestützt in HEK293 Zellen exprimiert (3.2.1.) und mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2) nachgewiesen (Abb. 8B).



4.1.1 Stabilität der NP-Mutanten

In einigen der im Folgenden beschriebenen Experimente war zu beobachten, dass sich die NP-Mutanten nach Inkubationszeiten über 48 h und besonders bei solitärer Expression deutlich schlechter nachweisen ließen als das unveränderte NP (NP_{wt}).

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die NP-Mutanten insgesamt weniger exprimiert wurden als der Wildtyp. Da aber in Versuchen mit einer kürzeren Inkubationszeit (≤ 48 h) das Expressionsniveau von NP_{wt} und den NP-Mutanten annähernd gleich war (siehe Kap. 4.1 Abb.8), stellte sich die Frage, ob die NP-Mutanten vielleicht bei Einzelexpression schneller abgebaut wurden als in Kombination mit NP_{wt}. Um dies zu überprüfen, wurde der Abbau der NP-Mutanten alleine und in Koexpression mit NP_{wt} in Anwesenheit des Translationshemmers Cycloheximid getestet (2.3.4). Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den für NP_{wt} und/oder den für die beiden NP-Mutanten kodierenden Plasmide transfiziert und nach 17 h Cycloheximid zum Zellkulturmedium hinzugegeben (Abb.9). Nach 8 h Inkubation mit Cycloheximid und noch deutlicher nach 21 h Inkubation war sichtbar, dass NP_{CCmut} in Anwesenheit von NP_{wt} langsamer abgebaut wird als alleine. Für NP_{ΔCC} war dieser Effekt nicht eindeutig nachweisbar.



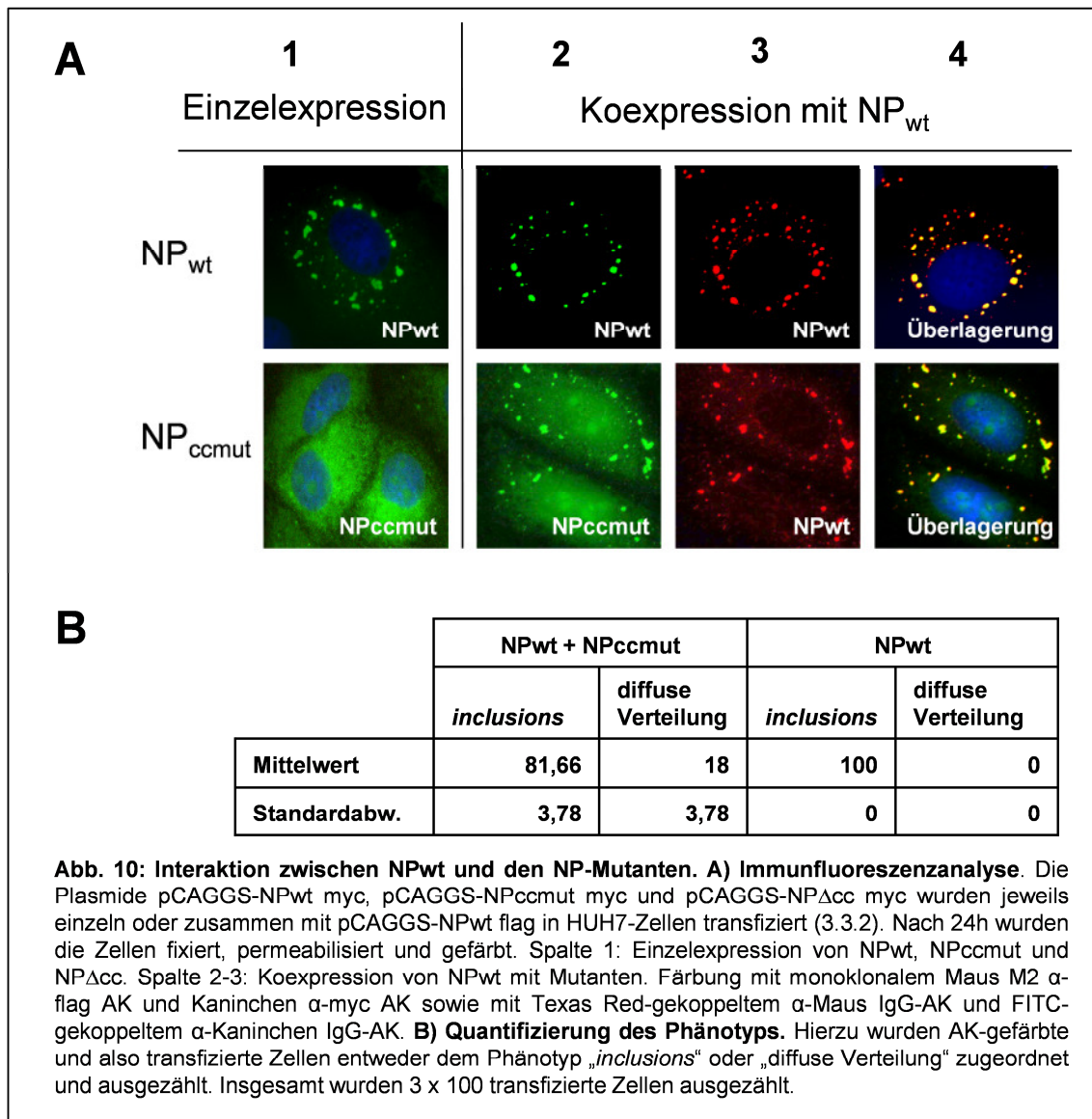
4.2 Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne des NP für die Interaktion mit den Nukleokapsidproteinen

Das Nukleokapsid von EBOV besteht aus der viralen RNA und den Proteinen NP, VP30 und VP35. Wird NP in Säugerzellen exprimiert, so formt es intrazelluläre Einschlusskörper, so genannter *inclusions* (Becker, Rinne et al. 1998; Modrof, Muhlberger et al. 2002). In Gegenwart von VP30 oder VP35 kann NP diese auch in die *inclusions* rekrutieren, was darauf hindeutet, dass NP mit VP30 und VP35 interagieren kann (Becker, Rinne et al. 1998; Modrof, Muhlberger et al. 2002; Modrof, Becker et al. 2003). Mit den folgenden Versuchen sollte die Rolle der Coiled-Coil-Domäne bei der

Interaktion von NP mit den anderen Proteinen des Nukleokapsidkomplexes näher bestimmt werden.

4.2.1 Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne auf die Interaktion des NP mit sich selbst

Zuerst sollte untersucht werden, in wie weit die Mutante NP_{ccmut} noch die Fähigkeit zur Interaktion mit NP besitzt. Dafür wurden die für NP oder die NP-Mutanten kodierenden Plasmide einzeln oder zusammen in HUH7-Zellen transfiziert, die Zellen für 24 h inkubiert, danach fixiert und permeabilisiert. Die intrazelluläre Verteilung der rekombinanten Proteine wurde anschließend einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (3.3.2).



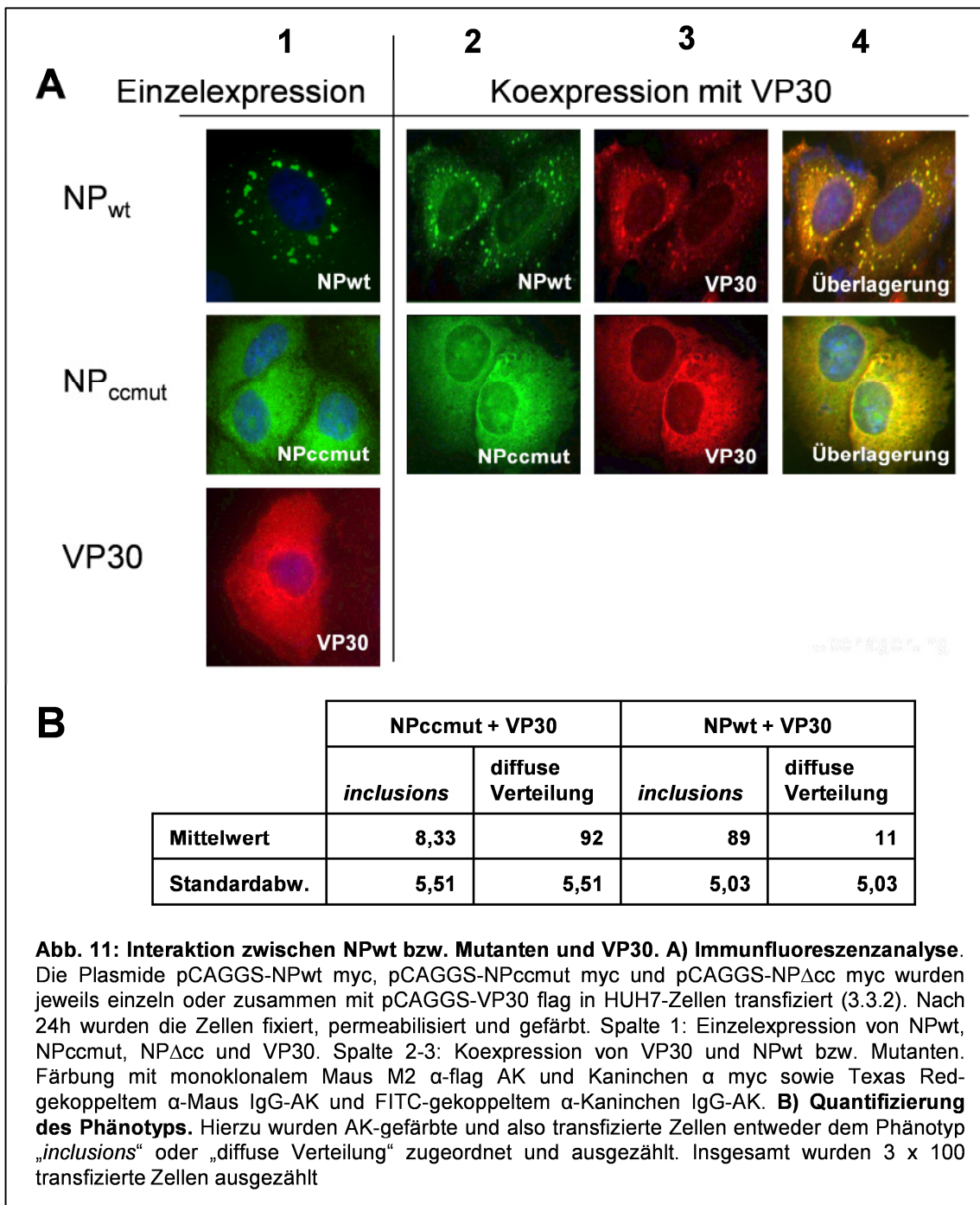
In der Einzelexpression (Abb. 10A, Spalte 1) wies NP die typischen, in der Größe variierenden, *inclusions* auf. Die Mutante NP_{ccmut} zeigte im Gegensatz dazu eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Bei Koexpression mit NP wurde die Mutante NP_{ccmut} in die durch NP_{wt} gebildeten *inclusions* rekrutiert (Abb. 10A, Spalte 2-4). Um die Fähigkeit der Mutante NP_{ccmut} zur Interaktion mit dem NP_{wt} zu quantifizieren, wurden am Fluoreszenzmikroskop Zellen ausgewertet, die entweder nur NP oder NP und NP_{ccmut} exprimierten. Entsprechend der auftretenden Verteilungsmuster wurden die Zellen den Phänotypen „*inclusions*“ oder „diffuse Verteilung“ zugeordnet und ausgezählt (Abb. 10B). Hierbei zeigte sich, dass NP_{wt} in 100% der Fälle *inclusions* bildete, bei Koexpression mit NP_{ccmut} lag allerdings nur noch in ca. 80% der Fälle eine Verteilung des NP in *inclusions* vor. Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen. Offensichtlich ist die Coiled-Coil Struktur des NP entscheidend für die Ausbildung der *inclusions*. Wird die Coiled-Coil Struktur verändert, kann das NP keine *inclusions* mehr ausbilden. Allerdings ist die Selbstinteraktion des NP durch die nicht ausgebildete Coiled-Coil-Struktur nicht vollständig inhibiert, so dass in Gegenwart von wildtypischem NP die Mutante NP_{ccmut} in die *inclusions* rekrutiert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das NP mehrere Selbstinteraktionsdomänen besitzt, die unterschiedliche Funktionen besitzen dürften.

4.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne des NP auf die Interaktion des NP mit VP30

Um den Einfluss der Coiled-Coil-Domäne auf die Interaktion des NP mit VP30 zu untersuchen, wurden die für NP_{wt} oder die NP-Mutanten kodierenden Plasmide einzeln oder zusammen mit VP30 in HUH7-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und die Verteilung der markierten Proteine mittels Immunfluoreszenz analysiert. Zur Verdeutlichung sind in Spalte 1 nochmals die Einzelexpressionen aufgeführt. Bei solitärer Expression lag VP30 diffus im Zytoplasma verteilt vor, bei Koexpression mit NP wurde VP30 jedoch in die von NP gebildeten *inclusions* rekrutiert (Abb. 11A, Spalte 2-4). Bei der Koexpression von NP_{ccmut} und VP30 waren beide diffus verteilt so dass eine Kolokalisation nicht überprüft werden kann.

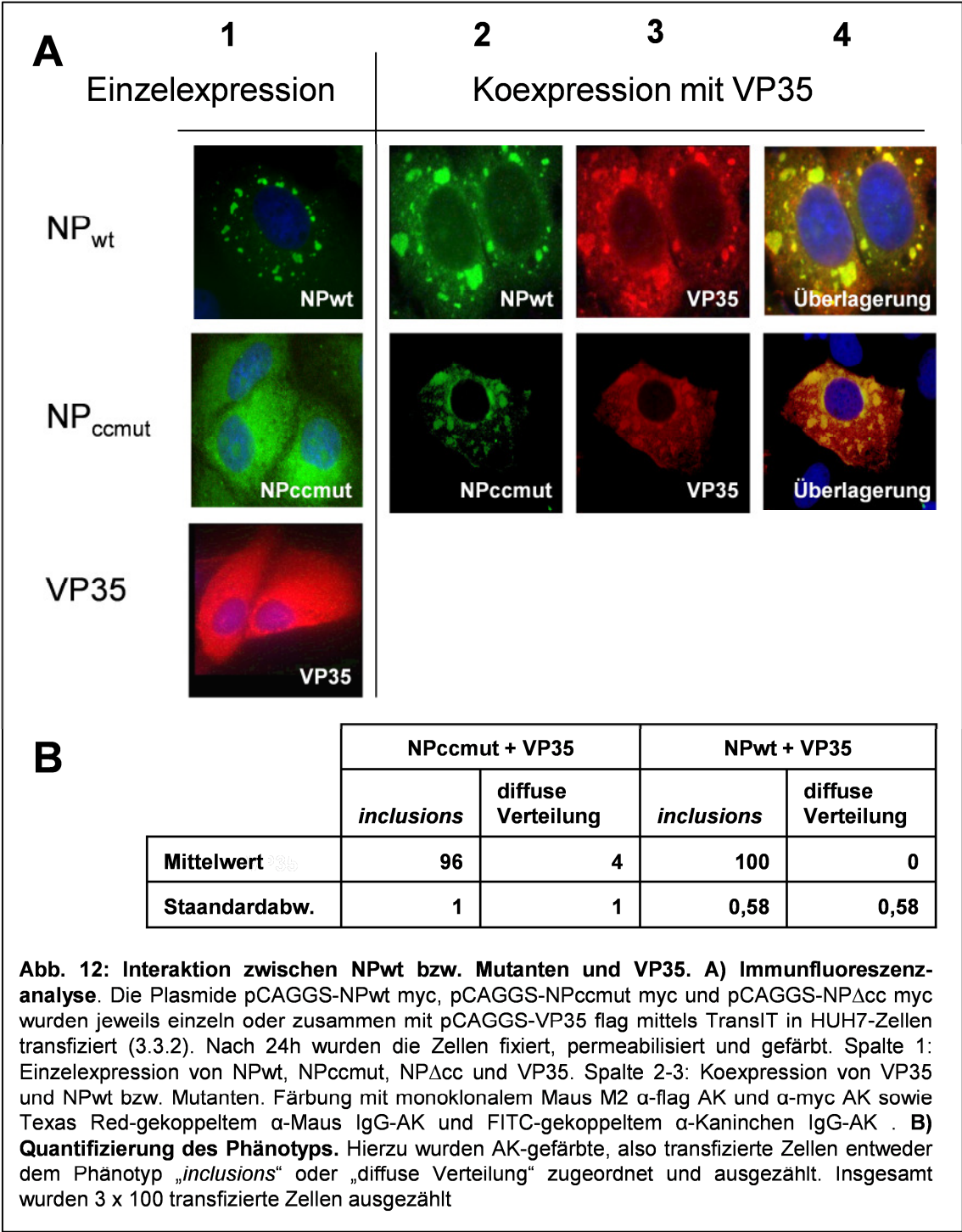
Um die Fähigkeit von NP und NP-Mutanten zur Interaktion mit VP30 zu quantifizieren, wurden NP oder NP_{ccmut} und VP30 exprimierende Zellen den Phänotypen „*inclusions*“ oder „diffuse Verteilung“ zugeordnet und ausgezählt (Abb. 11B). In Verbindung mit

VP30 bildete NP in ca. 90% der Fälle *inclusions*, die Mutante NP_{ccmut} nur noch in weniger als 10% der Fälle. Aus dem vorhergegangenen Experiment ist klar, dass die Coiled-Coil wichtig für die Bildung von *inclusions* ist, in wie weit diese auch wichtig ist um VP30 in *inclusions* zu rekrutieren, lässt sich aus der Immunfluoreszenz auf Grund der diffusen Verteilung beider Proteine nicht ableiten. Die Tatsache, dass NP in Gegenwart von VP30 nicht mehr in 100% der Fälle *inclusions* bildet, könnte auf eine geringe Interaktion von VP30 und NP außerhalb von *inclusions* hindeuten.



4.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Coiled-Coil-Domäne des NP auf die Interaktion des NP mit VP35

Im Folgenden sollte die Rolle der Coiled-Coil bei der Interaktion des NP mit VP35 untersucht werden. Hierfür wurden HUH7-Zellen mit den für VP35, NP_{wt} und die NP-Mutanten kodierenden Plasmiden transfiziert.



Nach 24h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Verteilung der Proteine in einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Abbildung 12A, Spalte 1 zeigt Einzelexpressionen von NP_{wt}, VP35 und NP-Mutanten. VP35 zeigte allein exprimiert eine geringe Akkumulierung. Wurde NP_{wt} oder NP_{ccmut} zusammen mit VP35 exprimiert, so wurde VP35, ähnlich wie das VP30, in *inclusions* rekrutiert. Obwohl NP_{ccmut} allein keine *inclusions* bildet, bewirkte die Koexpression mit VP35 eine Bildung von *inclusions* in denen auch VP35 nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit des NP zur Rekrutierung des VP35 in *inclusions* wurde quantifiziert (Abb. 12B). NP bildete in 100% der Fälle *inclusions* mit VP35, und auch die Mutante NP_{ccmut} war in nahezu 100% der Fälle noch dazu fähig. Ein NP mit beschädigter oder nicht vorhandenen Coiled-Coil scheint also noch in der Lage zu sein, mit VP35 zu interagieren.

4.2.4 Untersuchungen der Interaktion zwischen den Nukleokapsidproteinen mittels Koimmunpräzipitation

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse zu bestätigen, sollte die Interaktion zwischen NP und den NP-Mutanten auch durch Koimmunpräzipitationsanalyse (3.3.4) genauer untersucht werden. Hierbei fällt man mit einer antikörpergeköpelten Agarose Proteine, die ein bestimmtes Epitop enthalten sowie Proteine welche mit diesen interagieren.

Hierfür wurden HEK293-Zellen mit NP oder einer NP-Mutante (jeweils mit myc-Epitop) und, je nach Ansatz, NP_{flag}, VP30_{flag} oder VP35_{flag} kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und das Lysat mit α -flag M2-Agarose inkubiert. Nach 3 h Inkubationszeit wurden alle nicht an die Agarose gebundenen Proteine ausgewaschen. Anschließend wurde mit den Proben eine SDS-PAGE (3.3.1.1) und eine Western Blot (3.3.1.2) durchgeführt. Wenn nicht nur die flag-markierten Proteine NP_{wt}, VP30 und VP35 von der Agarose präzipitiert werden und im Western Blot nachweisbar sind, sondern auch die myc-markierten NP-Mutanten, so ist von einer Interaktion zwischen diesen Proteinen auszugehen. .

Bei diesem Versuch stellte sich heraus, dass das eingesetzte myc-markierte NP unspezifisch von der zur Präzipitation eingesetzten α -flag Agarose präzipitiert wurde. Dies verursachte einen hohen Hintergrund, der die Auswertung des Experiments verhinderte (nicht gezeigt). Auch viele weitere Versuche, die Signal-Hintergrund-Problematik durch verschiedene Waschpuffer und Änderungen des Protokolls zu lösen, blieben erfolglos.

4.3 Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne beim *self-assembly* von NP

Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Region von AS 1-450 essentiell für die Selbstinteraktion (*self assembly*) von NP ist (Watanabe, Noda et al. 2006). Im Folgenden sollte die Rolle der Coiled-Coil für die Selbstinteraktion des NP genauer untersucht werden.

Die Fragestellung lautete, ob die Coiled-Coil-Domäne alleine ausreichend für eine Interaktion zwischen zwei NP-Proteinen ist und ob diese Interaktion abhängig von der 3D-Struktur oder der Sequenz ist. Zu diesem Zweck wurde ein *Fluorescence Complementation Assay* mit Coiled-Coil-Fragmenten etabliert. Dabei wird ein fluoreszierendes Protein (hier *yellow fluorescent protein*, YFP) mittels molekularbiologischer Methoden in zwei Teile geteilt, die getrennt exprimiert werden. Nur wenn die beiden Teile eng miteinander in Verbindung gebracht werden, emittiert das Protein unter Fluoreszenzanregung Licht im gelben Spektrum. Die enge Verbindung wird hergestellt, indem die beiden Teile des YFP an Proteine fusioniert werden, von denen vermutet wird, dass sie miteinander interagieren. In diesem Fall werden durch die beiden Interaktionspartner die beiden Hälften des YFP in enge räumliche Nähe gebracht, sodass ein Fluoreszenzsignal entstehen kann. Mittels dieser Methode sollte untersucht werden, ob die Coiled-Coil-Strukturen des NP mit sich selbst interagieren und im *Complementation Assay* Fluoreszenzsignale zu erzeugen.

4.3.1 Untersuchung der Selbst-Interaktion der Coiled-Coil-Domäne des NP im *Complementation Assay*

Für den *Complementation Assay* (3.3.5) wurde YFP verwendet (Abb. 13A), welches aus 239 AS besteht und in diesem Versuch in zwei Hälften geteilt vorlag, eine mit 158 AS Länge (YFP1) und eine mit 81 AS Länge (YFP2). Diese waren allein nicht in der Lage, sich zu komplementieren und zu fluoreszieren (Abb. 13B). YFP1 und YFP2 wurden über einem 12 AS langen *linker* entweder mit der wildtypischen Coiled-Coil-Sequenz (NP AS 333-359) oder der mutierten Coiled-Coil-Sequenz (4.1, Abb 8) verbunden. Da nicht klar war, ob die Coiled-Coil N- oder C-terminal des YFP-Fragments liegen muss, um eine Interaktion zu vermitteln, mussten sowohl Konstrukte

mit N-terminalem YFP und mit C-terminalem YFP kloniert werden (Übersicht Abb. 13C).

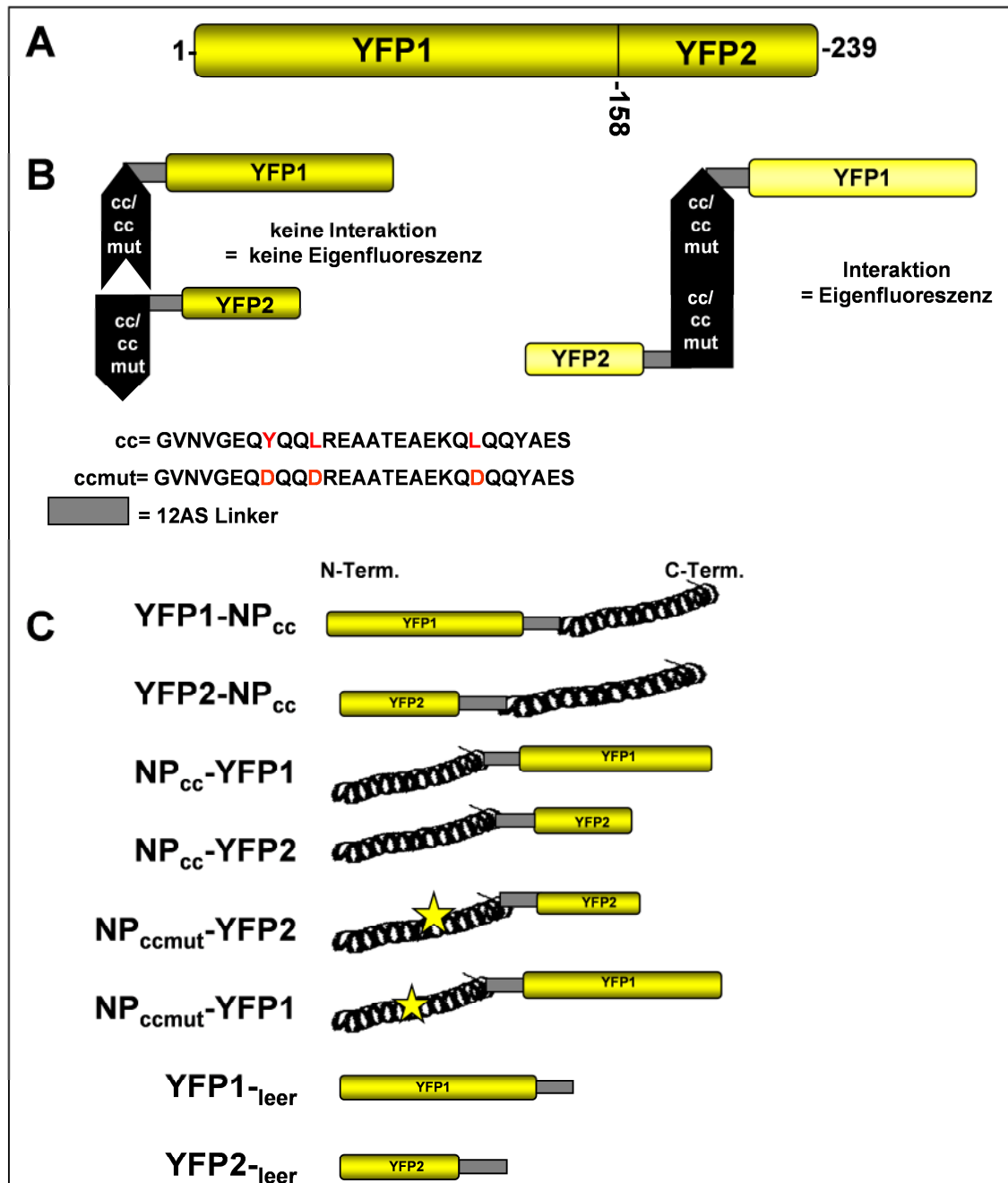
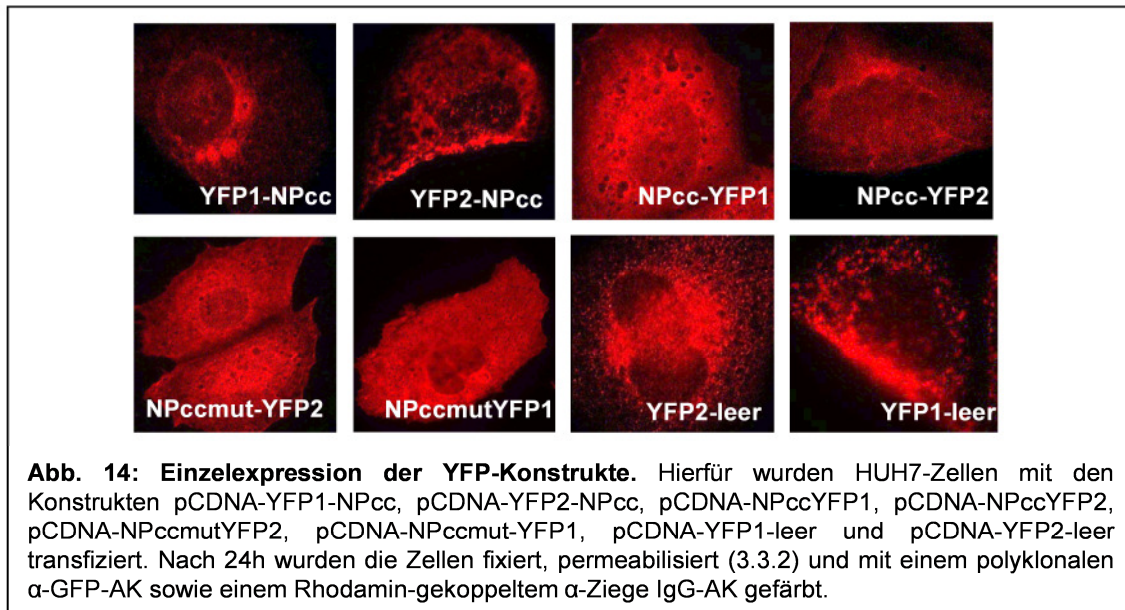


Abb. 13: YFP-Konstrukte für den Complementation Assay. A) Schema des YFP-Proteins: Es handelt sich um ein Protein von 239 AS Länge, dass sich in zwei Fragmente von 158 AS und 81 AS Länge teilen lässt (3.3.5) **B) Schema der geteilten YFP-Konstrukte:** Die YFP-Fragmente lagen in einem pCDNA Vektor vor. An jedes YFP-Fragment wurde ein 12AS-linker und entweder die wildtyp-Coiled-Coil-Sequenz oder die schon beschriebene mutierte Coiled-Coil-Sequenz, welche durch einen Stern symbolisiert wird, kloniert. **C) Für den Complementation Assay verwendete YFP-Konstrukte:** Insgesamt wurden sechs Plasmide mit der Coiled-Coil in wildtypischer oder mutierter Form kloniert, die Coiled-Coil wurde entweder N-terminal oder C-terminal des YFP-Fragments eingesetzt. Die jeweilige Schreibweise indiziert die Lage des YFPs und der Coiled-Coil. Als Negativkontrolle dienten zwei YFP-Fragmente ohne angehängte Coiled-Coil (YFP1-leer und YFP2-leer).

Als Negativkontrolle dienten zwei „leere“ YFP-Fragmente, die zwar einen Linker, aber keine Coiled-Coil-Sequenz besaßen und sich dementsprechend nicht komplementieren sollten. einzeln exprimiert werden.

HUH7-Zellen wurden hierfür mit je einem YFP-Konstrukt transfiziert, nach 24h fixiert und permeabilisiert und mit einem Antikörper die Expression des YFP-Fragments nachgewiesen. Abb. 14 zeigt die Einzelexpression der YFP-Konstrukte in der Immunfluoreszenz. Alle hergestellten Konstrukte konnten einzeln exprimiert werden.



Um herauszufinden, welche N- und C-terminal orientierten Coiled-Coil-Fragmente miteinander interagieren und damit die Eigenfluoreszenz des YFP vermitteln können, wurden je zwei für unterschiedliche YFP-Konstrukte kodierende Plasmide zusammen in HUH7-Zellen transfiziert und alle möglichen Kombinationen getestet. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und am Fluoreszenzmikroskop auf Eigenfluoreszenz untersucht (Abb. 15). Der Versuch zeigte, dass sich nur zwei unterschiedliche YFP-Fragmente komplementieren können, nur YFP1- oder nur YFP2-Fragmente zeigen keine Eigenfluoreszenz und dienen somit als Negativkontrolle. Des Weiteren zeigte sich, dass nur Fragmente interagieren können, bei denen die Coiled-Coil- oder mutierte-Coiled-Coil-Sequenzen N-terminal des YFP-Fragmentes eingefügt wurden.

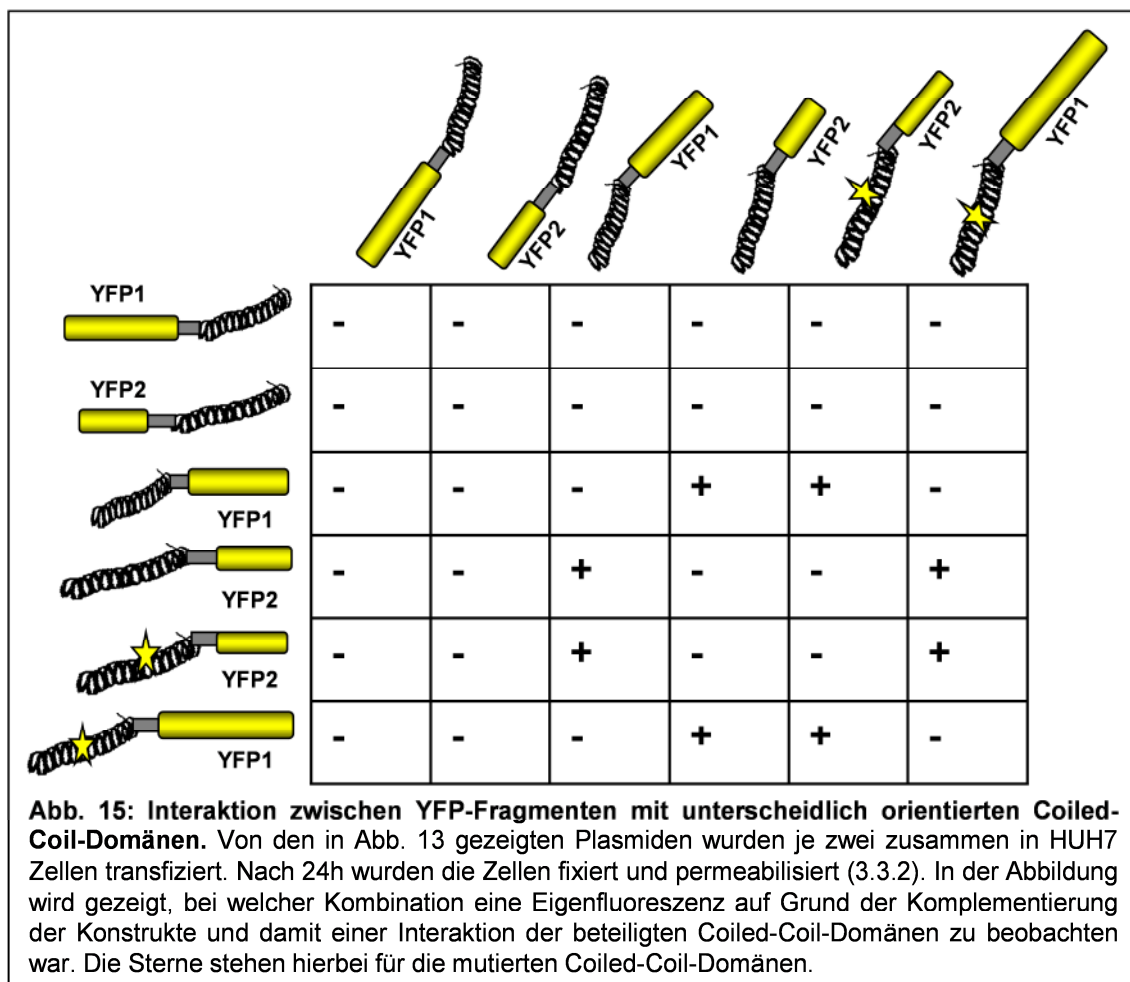


Abbildung 16A zeigt eine Übersicht der Kombinationen von YFP-Konstrukten, die eine Eigenfluoreszenz aufweisen die als Hinweis auf eine Interaktion der NP-spezifischen Peptide gedeutet wird. Da sowohl bei wildtypischen Coiled-Coil-Fragmenten als auch bei mutierten Coiled-Coil-Fragmenten Fluoreszenzsignale beobachtbar waren, sollten diese quantifiziert werden, um die Fähigkeit zur Interaktion der wildtypischen Coiled-Coil mit der der mutierten Coiled-Coil zu vergleichen. Hierfür wurden von allen transfizierten Zellen, in denen YFP immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, diejenigen gezählt, welche Eigenfluoreszenz im grünen Spektrum aufwiesen.

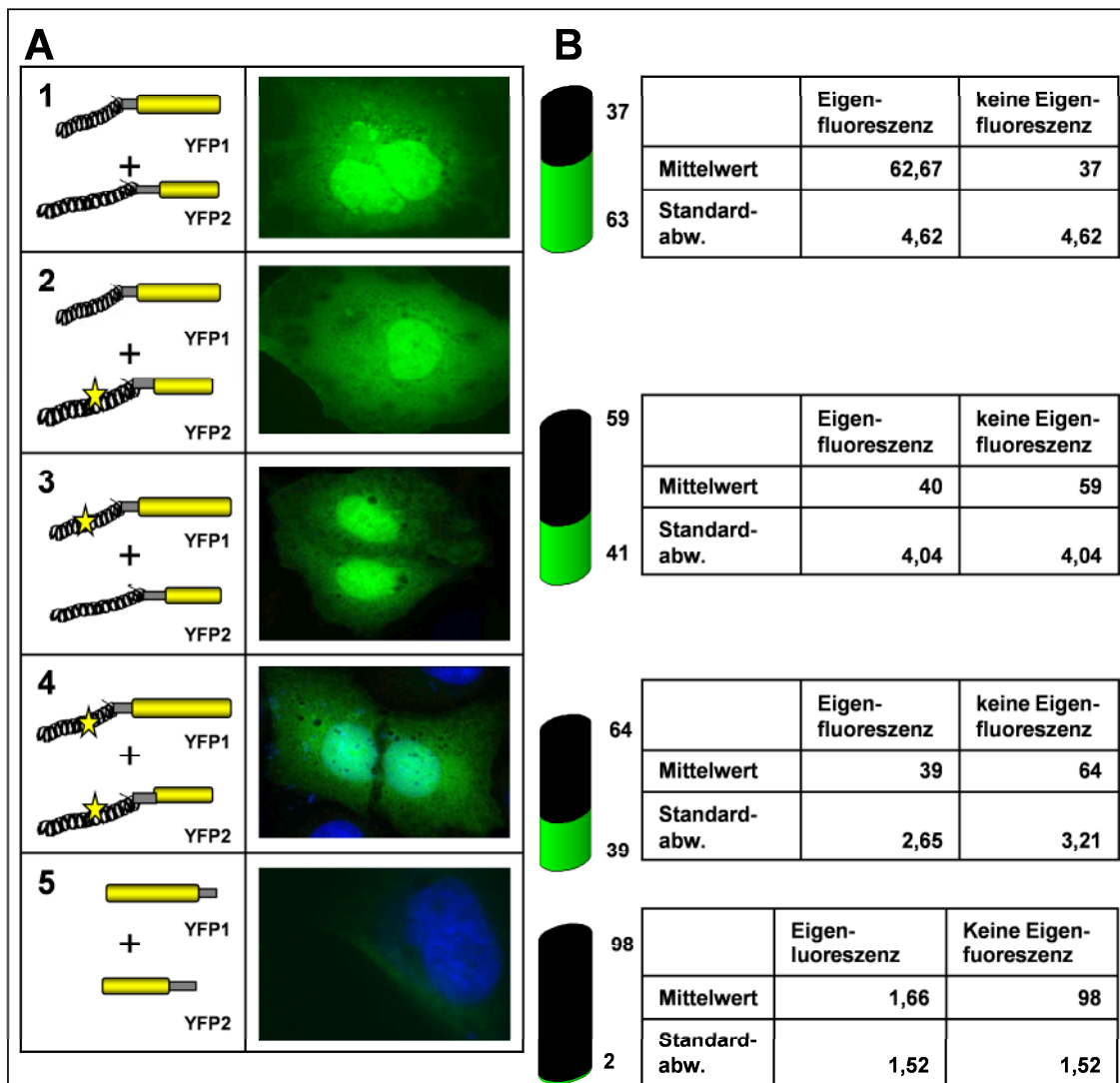


Abb. 16: Interaktion der Coiled-Coil-verbundenen YFP-Konstrukte im Complementation Assay **A) Fluoreszenzanalyse:** Hierfür wurden HUH7 Zellen mit den Konstrukten pCDNA-NPccYFP1 und pCDNA-NPccYFP2 (1), pCDNA-NPccYFP1 und pCDNA-NPccmutYFP2 (2), pCDNA-NPccmutYFP1 und pCDNA-NPccYFP2 (3), pCDNA-NPccmut-YFP1 und pCDNA-NPccmutYFP2 (4) oder pCDNA-YFP1-leer und pCDNA-YFP2-leer (5) transfiziert. Sichtbar ist die Eigenfluoreszenz der sich komplementierenden YFP-Fragmente nach Anregung im Fluoreszenzmikroskop ohne AK-Färbung. **B) Quantifizierung:** Hierzu wurden die Zellen zusätzlich mit einem polyklonalen Ziege α -GFP-AK sowie einem Rhodamin-gekoppeltem Esel α -Ziege IgG-AK gefärbt. Von den so angefärbten, transfizierten Zellen wurden diejenigen gezählt, die gleichzeitig eine grüne Eigenfluoreszenz zeigten. Insgesamt wurden je 3 x 100 transfizierte Zellen gezählt. Im Zylinderdiagramm ist der Anteil der nicht fluoreszierenden Zellen schwarz dargestellt, der Anteil der fluoreszierenden Zellen grün. Daneben sind die Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen aufgeführt.

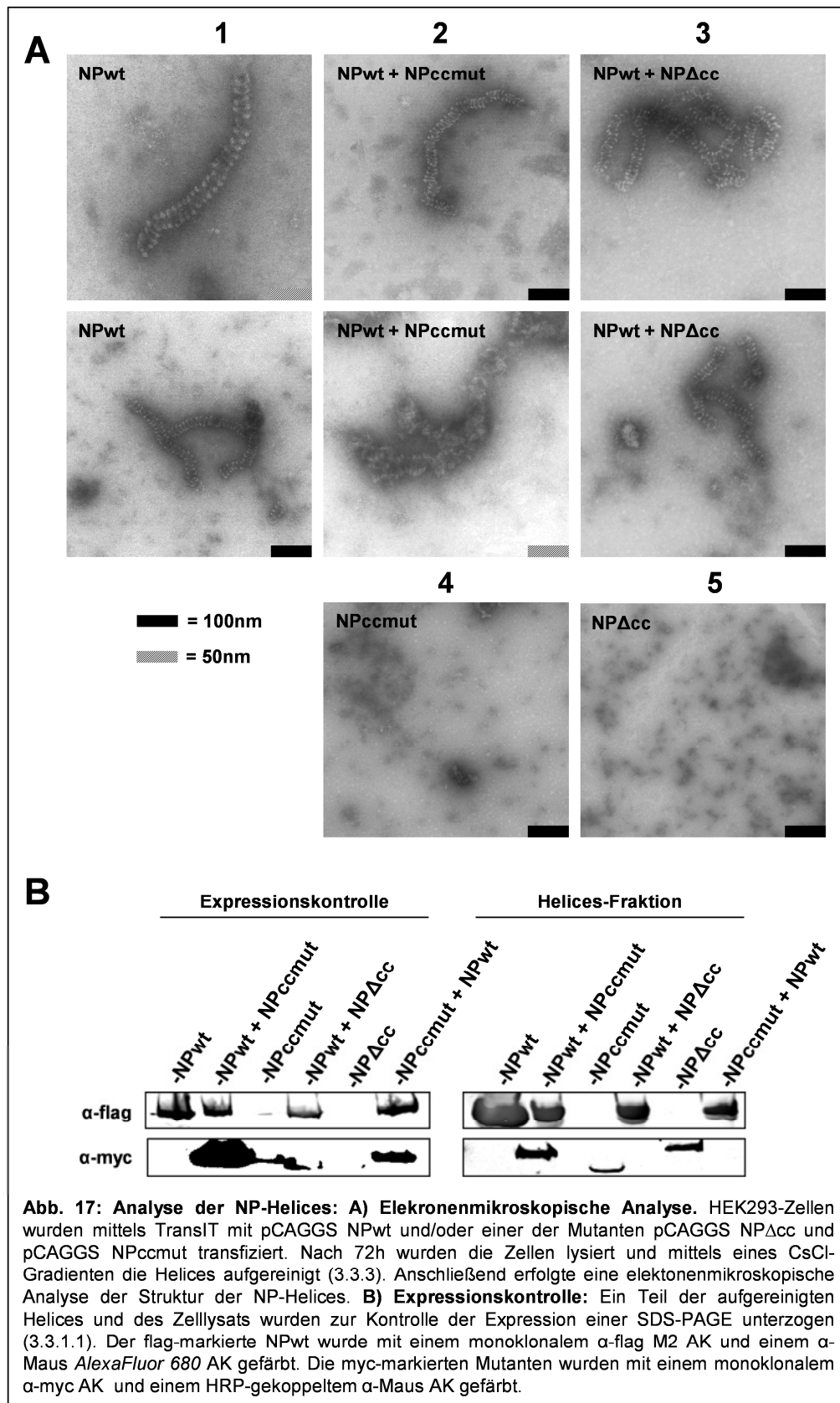
Wie in der Abbildung sichtbar, können zwei wildtypische Coiled-Coils eine Komplementierung der YFP-Konstrukte vermitteln (Abb. 16A, Zeile 1: NP_{cc}YFP1 und NP_{cc}YFP2), hierbei ist in ca. 60% der Zellen eine Fluoreszenz beobachtbar. Die Coiled-Coil scheint also allein ausreichend für eine Bindung zu sein.

Kotransfizierte man ein wildtypisches und ein mutiertes Coiled-Coil-Fragment, so war nur noch in ca. 40 von 100 transfizierten Zellen eine Eigenfluoreszenz beobachtbar (Zeile 2 und 3). Kotransfizierte man zwei mutierte Coiled-Coil-Konstrukte, so war ebenfalls in ca. 40% der Zellen eine Eigenfluoreszenz feststellbar (Zeile 4). Also scheint auch eine in ihrer 3D-Struktur gestörte Coiled-Coil-Sequenz eine Fähigkeit zur Selbstinteraktion zu besitzen, welche allerdings reduziert ist. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz (4.2.1) unterstützt, in der die NP-Mutanten ja auch nur in Gegenwart von NP_{wt} fähig waren, *inclusions* zu bilden. Als Negativkontrolle für diesen Complementation Assay dienten zwei „leere“ YFP-Fragmente, die allein keine Fluoreszenz zeigen sollten (Zeile 5). In der Quantifizierung zeigten sie tatsächlich nur ca. 2% Fluoreszenz, es kam also zu keiner relevanten Interaktion zwischen den leeren Fragmenten. Allerdings zeigt die Tatsache, dass selbst bei zwei wildtypischen Coiled-Coils 40% der transfizierten Zellen keine Fluoreszenz zeigten, dass der Hintergrund in diesem Versuch sehr hoch war, beziehungsweise, dass selbst der Wildtyp in diesem Versuch nicht sehr effektiv Bindungen vermitteln konnte. Bei der Interaktion der Coiled-Coil verbundenen YFP-Konstrukte scheint es sich jedoch um eine spezifische Interaktion zu handeln, da leere YFP-Fragmente sich nicht alleine zur Fluoreszenz komplettieren konnten sondern nur in Verbindung mit der (wildtypischen oder mutierten) Coiled-Coil. Die Coiled-Coil scheint also ausreichend zu sein, um eine Bindung der YFP-Fragmente zu vermitteln.

4.4 Die Bedeutung der NP-Coiled-Coil bei der Bildung von NP-Helices

NP kann allein Nukleokapsid-ähnliche Strukturen bilden, die sich von richtigen Nukleokapsiden durch ihren kleineren Durchmesser unterscheiden. Hierfür sind die AS 1-600 essentiell (Watanabe, Noda et al. 2006). Da die in vorherigen Kapiteln beschriebenen Versuche nahe legen, dass die Coiled-Coil-Region des NP zumindest für eine Bindung zwischen zwei NP-Proteinen ausreichend ist, stellte sich nun die Frage, welche Bedeutung diese Region bei der Bildung von NP-Helices haben. Hierzu sollte untersucht werden, in wie weit NP-Mutanten mit beschädigter oder ohne Coiled-Coil-Region noch in der Lage sind, NP-Helices zu bilden.

4.4.1 Elektronenmikroskopische Analyse der durch NP und den NP-Mutanten gebildeten Helices



Hierfür wurden der NP_{wt} oder die NP-Mutanten bzw. NP_{wt} mit je einer NP-Mutante zusammen in HEK293-Zellen exprimiert und nach 72 h die Zellen lysiert, die NP-Helices aus dem Zelllysats mittels Ultrazentrifugation über ein CsCl-Gradienten aufgereinigt (3.3.3). Die aufgereinigten NP-Helices wurden anschließend elektronenmikroskopisch analysiert (L. Kolesnikova). Hierbei ergab sich, dass der NP_{wt} regelmäßig geformte Helices bildet (Abb. 17 A, unter „1“).

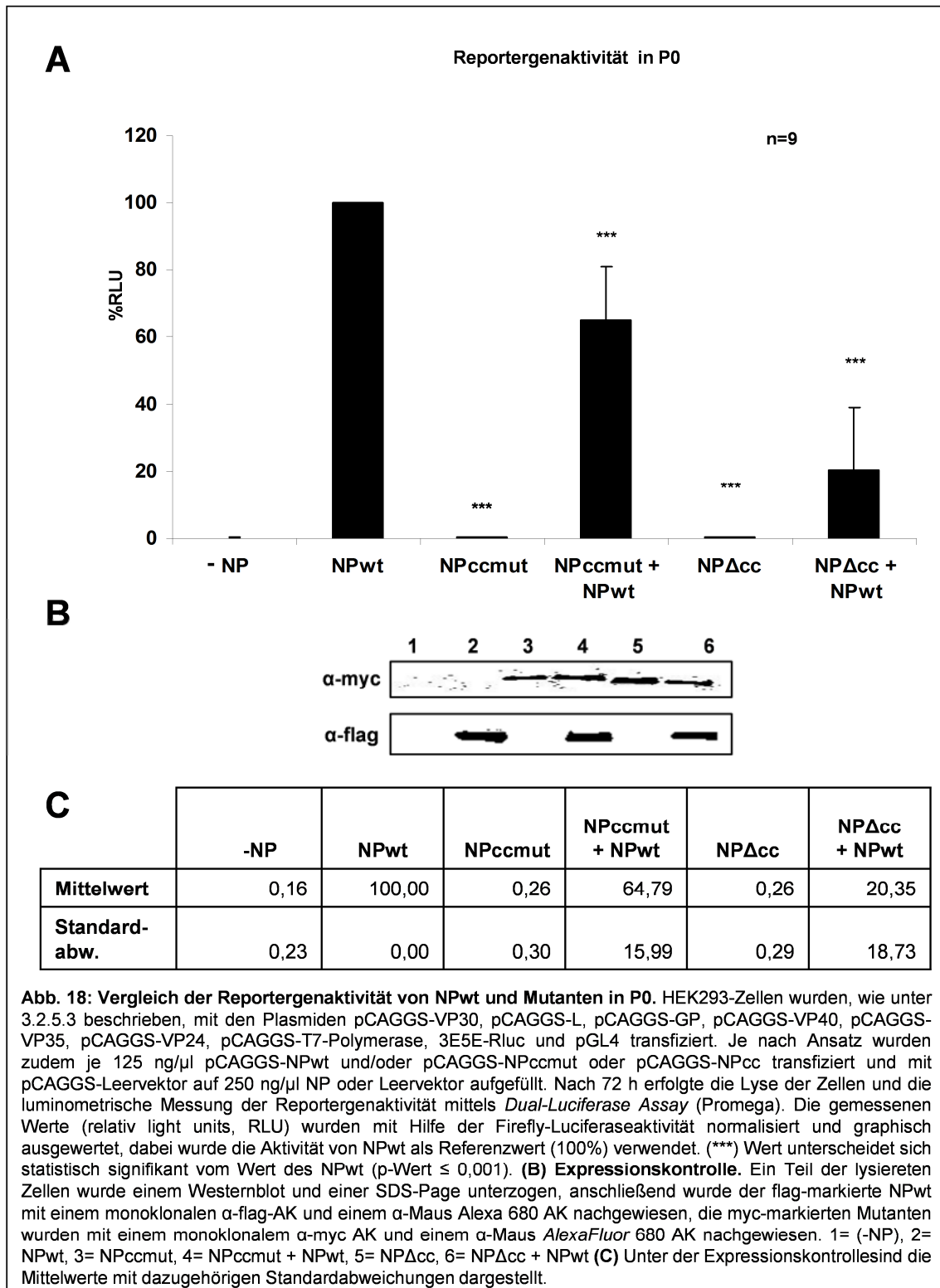
Allein exprimiert bildeten die NP-Mutanten keine Helices (Abb. 17A unter „4“ und „5“). Die Mutanten NP_{ccmut} und NP_{Δcc} konnten bei Koexpression mit NP_{wt} regulär geformte Helices bilden, ein Teil der Helices war allerdings auch deformiert (Abb. 17A unter „2“ und „3“). Parallel wurde das Zelllysats und ein Teil der Helices-Fraktion einer SDS-PAGE (3.3.1.1) und einem Western Blot (3.3.1.2) unterzogen. Der NP_{wt} war hierbei sowohl im Zelllysats als auch in der Helices-Fraktion des Gradienten nachweisbar. Die NP-Mutanten waren in der Helices-Fraktion nur in Koexpression mit dem NP_{wt} nachweisbar, was jedoch nach dem Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analyse zu erwarten war. Im Zelllysats war NP_{ccmut} bei Einzelexpression kaum nachweisbar, ergab aber ein Signal bei Koexpression mit dem wildtypischen NP. Die Mutante NP_{Δcc} war bei Einzelexpression nicht nachweisbar und ergab bei Koexpression mit NP nur ein schwaches Signal. Dies deutet auf den in Kapitel 4.1.1. (Abb. 8) gezeigten schnelleren Abbau der NP-Mutanten durch Proteasen hin. Deswegen kann aus diesem Versuch nicht eindeutig gefolgert werden, ob die fehlende Helix-Bildung der einzeln exprimierten NP-Mutanten auf eine Notwendigkeit der Coiled-Coil zur Bildung von Helices zurückzuführen ist oder auf einen frühzeitigen Abbau.

4.5 Die Bedeutung der Coiled-Coil-Domäne des NP für die virale Transkription

Von Watanabe et al. konnte für das Ebola Virus gezeigt werden, dass der N-terminale Anteil des NP, AS 1-450, eine wichtige Rolle im self-assembly des NP hat, aber alleine nicht die Replikation des viralen Genoms unterstützen kann (Watanabe, Noda et al. 2006). Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Effekt eine Mutation der Coiled-Coil, welche im Bereich der genannten Aminosäuren liegt, auf die virale Transkription besitzt.

4.4.1 Einfluss der NP-Coiled-Coil-Domäne auf Transkription in Passage 0

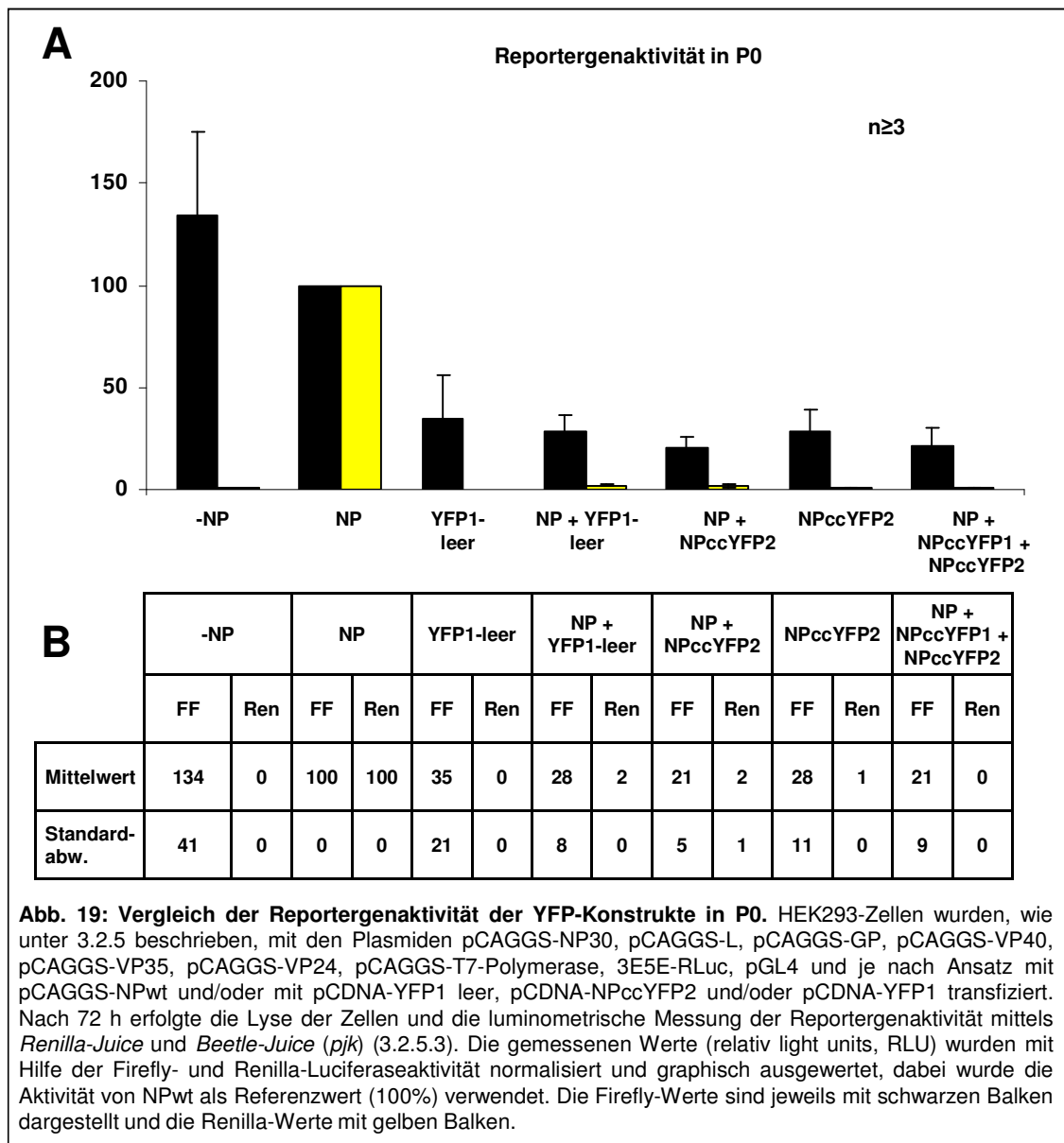
Zur Untersuchung der Aktivität der NP-Mutanten im Vergleich zum NP_{wt} wurden diese in einem iVLP Assay eingesetzt (zum Prinzip des iVLP Assays siehe 3.2.5).



Für diesen Assay wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden für alle ZEBOV-Proteine transfiziert. Je nach Ansatz wurde NP_{wt} und/oder eine der NP-Mutanten hinzutransfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und mittels des *Dual-Luciferase-Assays* von *Promega* die Aktivität der Renilla- und Firefly-Luciferase gemessen (3.2.5.3). Da das für das Firefly-Reportergen kodierende Plasmid unter Kontrolle des zellulären Promotors SV40 steht, stellte die Firefly-Aktivität die zelluläre Transkriptionsaktivität dar. Im Gegensatz dazu steht das im Minigenom von Leader- und Trailersequenzen des EBOV flankierte Renilla-Reportergen unter Kontrolle ZEBOV Promotors. Da die Renilla-Luciferase also die ZEBOV-spezifische Transkription zeigte und die Firefly-Luciferase die zelluläre Transkription, konnte man mit Hilfe der Firefly-Aktivität die Renilla-Werte normalisieren und die Transkriptionsaktivität der einzelnen Proben vergleichen. Abbildung 18 zeigt die Transkriptionsaktivität die sich bei Verwendung von NP_{wt} und den NP- Mutanten einstellte im Vergleich.

Die Reportergenaktivität in Gegenwart von NP_{wt} wurde als Referenzwert verwendet und mit 100% gleichgesetzt. Im Vergleich zu diesem Referenzwert kann man erkennen, dass die beiden Mutanten NP_{ccmut} und NP_{Δcc} allein nicht in der Lage sind, die Transkription zu unterstützen. Die NP-Mutanten zeigten in Gegenwart von wildtypischem NP einen dominant negativen Effekt. Dieser ist für NP_{ccmut} (noch ca. 60% Aktivität) nicht so ausgeprägt wie für NP_{Δcc} (nur noch ca. 30% Aktivität). Um bei der Untersuchung der Transkriptionsaktivität der NP-Mutanten den Einfluss anderer Regionen des NP auszuschließen, sollte auch der Effekt der Coiled-Coil-Region alleine getestet werden. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Experiment die für den Complementation-Assay klonierten NPcc-YFP-Konstrukte auch in einem VLP-Assay getestet. In Abbildung 19 ist der Einfluss der YFP-Konstrukte auf die Luciferaseaktivität im Vergleich zum NP_{wt} dargestellt.

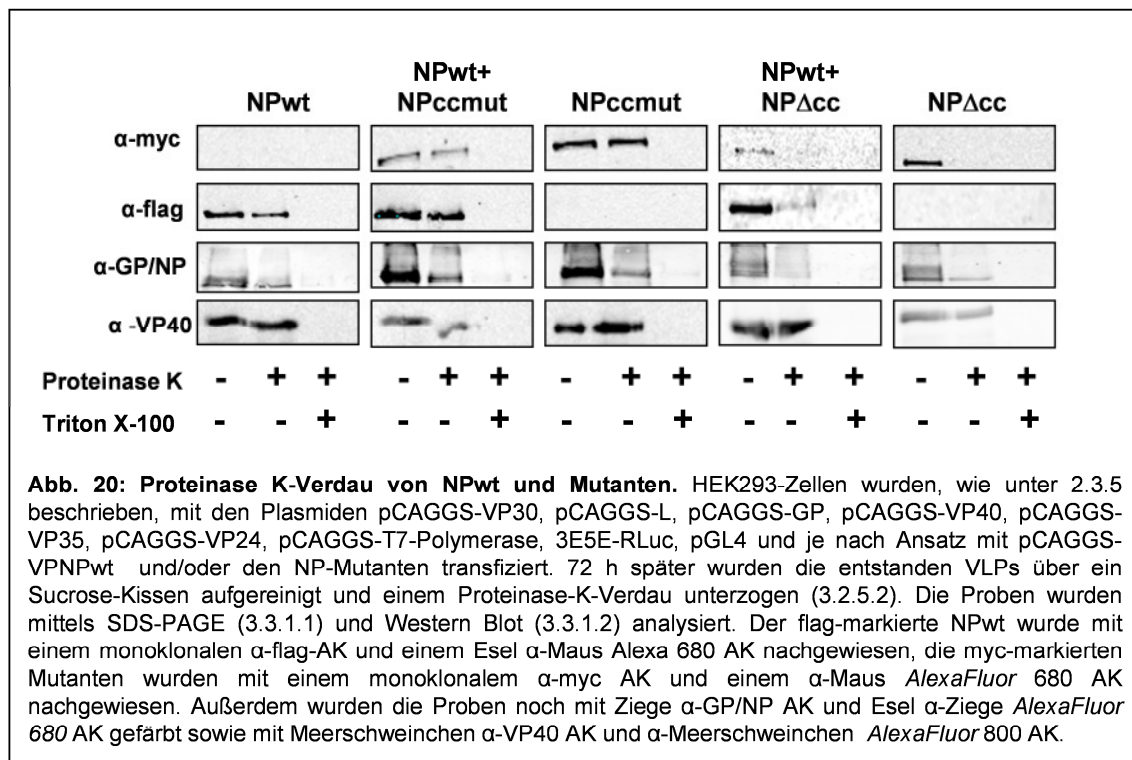
Bei diesem Experiment fiel zuerst auf, dass die spezifische Transkription, dargestellt durch die Renilla-Luciferaseaktivität, in Anwesenheit der YFP-Konstrukte abnahm. Allerdings nahm die zelluläre Transkription (dargestellt durch die Firefly-Luciferase) bei Anwesenheit von YFP-Konstrukten ebenfalls ab, und dies unabhängig von der Anwesenheit eines Coiled-Coil-Fragments (siehe Abb. 19 „YFP1_{-leer}“ und „NP + YFP2_{-leer}“). Hierbei handelte es sich also um keine spezifische Wirkung der Coiled-Coil-Region sondern eher um einen unspezifischen Effekt durch die YFP-Fragmente, welcher auch die zelluläre Transkription betrifft. Es konnte also gezeigt werden, dass die NP-Mutanten alleine nicht in der Lage sind, Transkription zu unterstützen und in Gegenwart von NP_{wt} einen dominant negativen Effekt haben



4.4.2 Nachweis des Einbaus der NP-Mutanten in VLPs

Um zu überprüfen, ob die NP-Mutanten in die VLPs eingebaut werden und damit für die nachfolgende Infektion von naiven Zielzellen zur Verfügung stehen, wurde ein Proteinase K-Verdau der im vorherigen Versuch produzierten VLPs vorgenommen (3.2.5.2). Hierfür wurde der Überstand der Zellen abgenommen, und die VLPs daraus mittels Ultrazentrifugation über ein Sucrosekissen aufgereinigt und mit Proteinase K verdaut. Da Proteinase K alle Proteine abbaut, die nicht von einer Membran umgeben und durch diese geschützt sind, sollten die NP-Mutanten, falls sie wie NP_{wt} in die VLPs

inkorporiert werden, vor dem Abbau geschützt sein. Zur Kontrolle wird in einem parallelen Ansatz neben Proteinase K auch das Detergens Triton X-100 zugesetzt, welches Membranen auflöst und so auch membrangeschützte Proteine zum Abbau durch Proteinase K freigibt. Nach dem Verdau werden die Proben per SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2) analysiert. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Proteinase K-Verdaus: der NP_{wt} und die Mutante NP_{ccmut} wurden, wie jeweils in der mittleren Spur zu erkennen ist, in VLPs eingebaut, die Mutante NP_{Δcc} war zumindest mit α-myc nicht in den VLPs nachweisbar, wohl aber mit einem α-GP/NP-AK. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich ein schnellerer Abbau der Mutante bei alleiniger Expression sein (siehe Versuch 4.1.1). Insgesamt zeigt dieser Versuch, dass beide Mutanten wie der NP_{wt} in VLPs eingebaut werden.

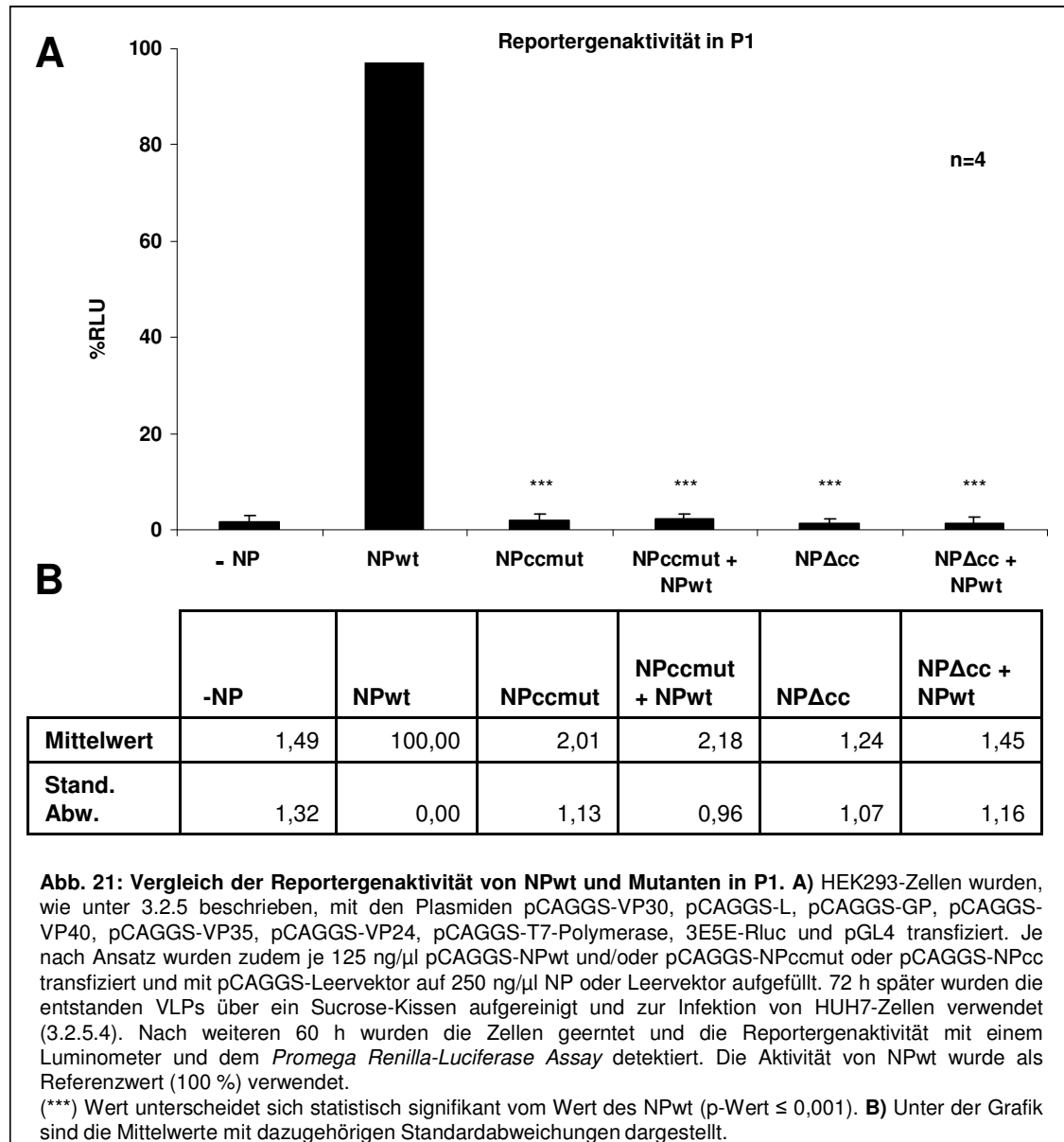


4.4.3 Einfluss der NP- Coiled-Coil-Domäne auf Transkription in Passage 1

Nachdem der Einbau der NP-Mutanten in iVLPs im vorherigen Versuch bewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage nach dem Einfluss der Mutanten bei der Infektion von Zellen mit iVLPs. Dies ist besonders interessant, da das Reportergen, welches durch die iVLPs in die Zelle eingebracht wurde, auch ausschließlich durch die

iVLP-assoziierten viralen Proteine bewerkstelligt werden muss. Solche Bedingungen herrschen in der Frühphase einer viralen Infektion.

Abbildung 21 zeigt die Reportergenaktivität in den Zielzellen in Gegenwart der NP-Mutanten im Vergleich zum NP_{wt}. Hierbei ist zu sehen, dass in Gegenwart der NP-Mutanten allein keine Transkription induziert werden konnte. Im Gegensatz zum Verhalten in den transfizierten Zellen konnten die NP-Mutanten aber selbst in Gegenwart von NP_{wt} keine Transkription mehr vermitteln.



Dies ist ein Ergebnis, welches nach den in Abb. 18 gezeigten Ergebnissen zu erwarten war, da in den iVLP infizierten Zellen die Menge der viralen Proteine deutlich begrenzt sind. Der dominant negative Effekt der NP-Mutanten wird also nicht durch ein

Überangebot an wildtypischem NP ausgeglichen. Außerdem kann hier auch nur noch die Reporterogenaktivität des in den VLPs vorhandenen Minigenoms gemessen werden.

Der Versuch zeigt also, dass die NP-Mutanten unter Infektionsbedingungen einen ausgeprägten dominant negativen Effekt haben und, bei gleichen Mengen NP_{wt} und NP-Mutanten weder allein noch in Gegenwart von NP_{wt} Transkription vermitteln können.

In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Coiled-Coil-Domäne des NP wichtiger für die Interaktion von mit VP30 ist als mit VP35. Weiterhin scheint die Bildung von NP- Einschlusskörpern, so genannter *inclusions*, von der Coiled-Coil-Domäne abzuhängen, ebenso wie die Bildung von NP-Helices. Die Coiled-Coil-Domäne scheint allein ausreichend für eine NP-NP Bindung zu sein und eine nicht intakte Coiled-Coil ist hat einen dominant negativen Effekt auf die virale Transkription.

5. Diskussion

Das Nukleoprotein (NP) des EBOV enkapsidiert die virale RNA und ist Hauptbestandteil des Nukleocapsidkomplexes welcher als Matrize für die virale Replikation und Transkription dient (Elliott, Kiley et al. 1985; Muhlberger, Weik et al. 1999). Das NP lässt sich in einen hydrophilen C-Terminus und einen hydrophoben N-Terminus unterteilen (Sanchez, Kiley et al. 1989). Der N-Terminus weist eine hohe Sequenzhomologie mit MARV-NP auf und ist auch den Nukleoproteinen anderer Viren der Ordnung Mononegavirales ähnlich (Sanchez, Kiley et al. 1992). Bei den Mononegavirales lässt sich generell eine Unterteilung des Nukleoproteins in einen für das *self assembly* und die RNA-Interaktion zuständigen N-Terminus (Buchholz, Spehner et al. 1993; Myers, Pieters et al. 1997) sowie einen mit dem Polymerase-Komplex und vermutlich auch dem Matrixprotein interagierenden C-Terminus beobachten (Monson, Cole et al. 1987). Der C-Terminus ist hierbei im Gegensatz zum N-Terminus hoch variabel, zeigt keine stabile Sekundär- oder Tertiärstruktur (intrinsisch unstrukturiert) und wird bei einigen Viren der Ordnung Mononegavirales auf der Oberfläche des Nukleokapsids präsentiert (Heggeness, Scheid et al. 1980; Longhi, Receveur-Bréchet et al. 2003; Bourhis, Receveur-Bréchet et al. 2005).

Im NP des MARV konnten zwei Coiled-Coil-Domänen identifiziert werden. Bei Proteinen mit Coiled-Coil-Domänen geht man davon aus, dass diese 3D-Struktur eine essentielle Rolle für die Funktion des Proteins spielt, zum Beispiel durch Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Curran, Boeck et al. 1995; Burkhard, Stetefeld et al. 2001). Bei MARV-NP scheinen die Coiled-Coils eine wichtige Rolle für das *self assembly* und die Interaktion mit VP35 zu spielen und besitzen eine essentielle Rolle für die virale Transkription (DiCarlo, Möller et al. 2007). Da für das EBOV-NP *in silico* ebenfalls eine Coiled-Coil-Domäne festgestellt werden konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit deren Rolle für die Interaktion des NP mit den Proteinen des Nukleokapsidkomplexes sowie das *self assembly* des NP und dessen Rolle bei der Transkription näher untersucht werden.

Diese Diskussion gliedert sich dementsprechend in die Unterpunkte *Interaktion mit VP35*, *Interaktion mit VP30*, *Selbstinteraktion des NP* und *Einfluss der Coiled-Coil-Domäne auf die virale Transkription*.

Interaktion mit VP35

Das Nukleokapsidprotein VP35 wird als das Analogon zum Phospho-(P)-Protein der Mononegavirales angesehen (Becker, Rinne et al. 1998; Muhlberger, Lotfering et al. 1998). Es dient als Polymerase-Ko-Faktor, indem es die virale Polymerase L zur RNA rekrutiert. VP35 oligomerisiert dazu selbst über ein Coiled-Coil-Motiv (Moller, Pariente et al. 2005). In der Immunfluoreszenzanalyse kann man beobachten, dass VP35 von NP in durch NP gebildete Einschlusskörper, so genannte *inclusions*, rekrutiert wird, welche als Ort der viralen Transkription, Replikation und *assembly* angesehen werden. Dies sollte sich in dieser Arbeit zu nutze gemacht werden, um das Verhalten von NP-Mutanten ohne oder mit beschädigter Coiled-Coil mit dem NPwt zu vergleichen. Es war zu beobachten, dass VP35 sowohl vom NPwt als auch von beiden Mutanten in *inclusions* akkumuliert werden konnte. Die Mutante mit beschädigter Coiled-Coil besaß diese Fähigkeit im Vergleich zum NPwt in fast unveränderter Form, in 90% der transfizierten Zellen fand eine Kolo-kalisierung statt, beim NPwt in 100%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Interaktion mit VP35 weitestgehend unabhängig von der Coiled-Coil-Domäne ist und eine andere Region im NP wichtiger für die Bindung von VP35 sein muss. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollte ein Koimmunpräzipitation durchgeführt werden, welche jedoch wegen unspezifischer Bindungen nicht auswertbar war. Aus früheren Koimmunpräzipitationen ist aber abzusehen, dass noch eine Interaktion zwischen NP-Mutanten und VP35 besteht (unveröffentlichte Daten von N. Biedenkopf). Als weitere Möglichkeit zur Analyse der Interaktion zwischen NP und VP35 bliebe ein Nachweis von VP35 in VLPs mit den jeweiligen NP-Mutanten. VP40 kann allein VLPs induzieren, die richtigen Viruspartikeln ähnlich sind, und NP in diese rekrutieren. Man könnte untersuchen, ob in solchen VLPs NP oder die NP-Mutanten VP30 und VP35 mit in die VLPs rekrutieren.

Im Falle der beiden Coiled-Coil-Domänen des MARV-NP konnte beobachtet werden, dass besonders die erste eine Bedeutung für die Bindung mit VP35 hat (DiCarlo 2004). Da bei EBOV-NP nur eine Coiled-Coil vorhanden ist, muss die Situation hier anders sein.

Bei einigen Paramyxoviren ist bekannt, dass die Bindungsstelle für das P-Protein auf dem NP aus mehreren Teilen besteht. So konnten für das humane Parainfluenzavirus Typ 2 (hPIV-2) zwei nebeneinander liegende Bindungsdomänen auf dem Nukleoprotein (N) nachgewiesen werden, eine für den C-Terminus des P und eine für den N-Terminus (Nishio, Tsurudome et al. 1999).

Das Masernvirus (MV) P-Protein scheint an C-terminalen und N-terminalen Anteilen des Nukleoproteins zu binden: mittels Deletionsmutanten wurden zwei nicht zusammenhängende Regionen auf dem Nukleoprotein gefunden, die beide für die Bildung von N-P-Komplexen wichtig sind (Harty und Palese 1995; Bankamp, Horikami et al. 1996).

Für die Interaktion zwischen EBOV-NP und VP35 wäre ebenfalls denkbar, dass es mehr als eine Bindungsstelle gibt. Dies würde auch erklären, warum eine beschädigte Coiled-Coil-Region nur einen geringen Effekt auf die Bindung von VP35 hat.

Für das Matrixprotein EBOV-VP40 ist ebenfalls bekannt, dass es an zwei Domänen des NP gebunden wird, den extremen N- und C-Terminus (AS 1-150 und 601-739) (Noda, Watanabe et al. 2007).

Da der Effekt der NP-Mutanten auf die NP-VP35 Interaktion allerdings sehr gering ist, wäre es auch denkbar, dass VP35 gar nicht direkt im Bereich der Coiled-Coil bindet und die leicht herabgesetzte Fähigkeit zur Interaktion indirekt aus einer Konformationsänderung des NPs durch die veränderte 3D-Struktur der Coiled-Coil-Domäne hervorgeht.

Man kann also sagen, dass die Coiled-Coil keine große Rolle in der Interaktion mit VP35 spielt, was daran liegen könnte dass es, wie bei anderen Mononegavirales auch, mehrere Bindungsstellen für das VP35 geben könnte oder aber VP35 nicht im Bereich der Coiled-Coil bindet.

Interaktion mit VP30

VP30 wird vermutlich benötigt um eine Sekundärstruktur im 3'-Bereich der viralen RNA zu überwinden und so die Transkription zu aktivieren (Weik, Modrof et al. 2002). Außerdem scheint es den Übergang zwischen viraler Transkription und Replikation zu regulieren sowie die Reinitiation der Transkription (Modrof, Muhlberger et al. 2002; Martinez, Biedenkopf et al. 2008). Die meisten Viren der Ordnung Mononegavirales besitzen nur drei Nukleokapsidproteine, VP30 nimmt deshalb als viertes, zusätzliches Nukleokapsidprotein eine Sonderrolle ein. Nur das Respiratorische Syncytialvirus (RSV), ein Pneumovirus aus der Familie der *Paramyxoviridae*, besitzt auch vier Nukleokapsidproteine. Hier ist das M2-1 Protein als Antiterminator an der Regulation der Transkription beteiligt (Collins, Hill et al. 1995). Für EBOV-VP30 konnte gezeigt werden, dass dieses zwei Domänen hat, mit Hilfe derer es an NP bindet (Hartlieb,

Muziol et al. 2007). Eine Studie zur Bindungsdomäne des VP30 im NP legt auch nahe, dass es zwei Regionen gibt, in denen N- und C-Terminus des VP30 binden. Im Rahmen dieser Studie wurde auch festgestellt, dass zur Bindung des VP30 die AS 339-416 des NP essentiell sind (Biedenkopf 2007).

Die in dieser Arbeit untersuchte Coiled-Coil-Domäne liegt in dieser für die Interaktion mit NP essentiellen Region. In der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass ein NP mit beschädigter oder ohne Coiled-Coil-nicht mehr VP30 in *inclusions* relokalisieren kann, die Interaktion zwischen NP und VP30 scheint also sehr eingeschränkt zu sein. Die Fähigkeit war bei beschädigter Coiled-Coil im Vergleich zum NPwt fast ganz aufgehoben (nur noch in 10% der Fälle kam es zur Akkumulation in *inclusions* im Vergleich zu 100% der Fälle beim Wildtyp). Aufgrund der diffusen Verteilung von NP und VP30 konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob beide außerhalb der *inclusions* kolokalisieren und ob überhaupt noch eine Interaktion zwischen VP30 und NP besteht. Die zur Bestätigung durchgeführte Koimmunpräzipitation lieferte wegen mangelnder Reliabilität durch das Auftreten von unspezifischen Bindungen auch hier keine genaueren Informationen. Eine andere Methode, die Interaktion weiter zu untersuchen wäre, wie schon für VP35 vorgeschlagen, ein Nachweis von VP30 in VLP's, welche außer VP30 und VP40 ausschließlich eine der NP-Mutanten erhalten.

Anhand der vorgestellten Ergebnisse lässt sich ableiten, dass NP ohne intakte Coiled-Coil-Domäne nicht mehr VP30 in die *inclusions* und damit zum Ort der Nukleokapsidbildung rekrutieren kann, und es kann vermutet werden, dass die Interaktion zwischen NP und VP30 insgesamt sehr eingeschränkt ist. Dies könnte einerseits durch eine direkte Bindung des VP30 im Bereich der Coiled-Coil erklärt werden. Andererseits könnte aber auch die Coiled-Coil-Domäne die Faltung des NP so beeinflussen, dass die Bindungsstelle für das VP30 nur in Gegenwart der Coiled Coil-Domäne verfügbar ist. So wird für MARV-NP einer Interaktion des N- und C-Terminus angenommen

Für das M2-1 Protein des RSV, also das einzige weitere vierte Nukleokapsidprotein in der Ordnung Mononegavirales, konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion mit dem N-Protein durch RNA vermittelt wurde (Cartee und Wertz 2001). Ob RNA eine Rolle bei der Bindung von EBOV-VP30 und NP spielt, ist nicht bekannt, kann aber ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die Coiled-Coil-Domäne hat also einen großen Einfluss auf die Interaktion von VP30 und NP, entweder durch eine direkte Bindung in diesem Bereich, durch eine von dieser

Region ausgehenden Konformationsänderung oder einen Einfluss auf eine eventuelle RNA-Interaktion.

Selbstinteraktion des NP (*self assembly*)

Die Mononegavirales zeigen eine hohe Sequenzhomologie im N-Terminus, der für die NP-NP-Interaktion wichtig ist. Die AS 230 bis 370 sind besonders ähnlich zu den N-Proteinen der Paramyxoviren und in geringerem Umfang auch zu denen der Rhabdoviren (Sanchez, Kiley et al. 1992).

Von Watanabe et al. konnte gezeigt werden, dass die AS 1-450 des EBOV-NP essentiell für dessen Selbstinteraktion sind und sich zu tubulären Strukturen von 25 nm Durchmesser zusammenlagern können. Das Fragment NP AS 1-600 kann wiederum bereits Nukleokapsid-ähnliche Strukturen bilden, welche wie richtige Nukleokapside einen äußeren Durchmesser von 50 nm und einen inneren Hohlraum von 20 nm haben. Diese Nukleokapsid-ähnlichen Strukturen sind auch zur Transkription befähigt (Watanabe, Noda et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass NP ohne intakte Coiled-Coil keine *inclusions* formen kann, allerdings kann es noch in von NPwt geformte *inclusions* rekrutiert werden. Dieses Ergebnis deutet bereits darauf hin, dass die Coiled-Coil wichtig für das *self assembly* des NP ist, es hierfür aber noch andere wichtige Regionen innerhalb des Proteins gibt. Um herauszufinden, ob die Coiled-Coil Domäne alleine für eine NP-NP Bindung ausreichend wäre, wurde in einem Complementation Assay getestet, ob zwei Coiled-Coil Fragmente, jeweils gebunden an einen Teil eines Reporterproteins, sich binden können. Tatsächlich konnten diese sich binden und so die Autofluoreszenz der einzeln nicht Licht emittierenden Reporterproteinteile vermitteln. Interessanterweise waren auch Sequenzen ohne Coiled-Coil-3D-Konformation fähig, dies zu tun, wenn auch in vermindertem Ausmaß (in nur 30% der transfizierten, also GFP-AK positiven, Zellen im Vergleich zu 60% der mit Wildtyp-Coiled-Coil transfizierten Zellen). Hierzu muss man beachten, dass der zum Nachweis der Transfektion gebrauchte Antikörper beide YFP-Fragmente erkannte. Der Anteil der mit beiden Fragmenten transfizierten Zellen wird also niedriger sein als die Gesamtzahl der mit Antikörper markierten Zellen und damit das Verhältnis der fluoreszierenden an den mit beiden Konstrukten transfizierten Zellen etwas höher als gemessen

Zusammengefasst deutet dieser Versuch, ebenso wie die Ergebnisse der Immunfluoreszenz, darauf hin, dass die NP Coiled-Coil ausreichend für einen NP-NP Bindung ist und die 3D-Konformation bei dieser Bindung eine große Rolle spielt, da sich nach Ausschaltung der 3D-Struktur das Potential zur Bindung um circa die Hälfte reduziert ist. Trotzdem scheint aber auch NP mit beschädigter Coiled-Coil noch in geringem Ausmaß fähig zur Selbstinteraktion zu sein.

In einem weiteren Versuch sollte herausgefunden werden, ob NP mit beschädigter oder deletierter Coiled-Coil noch Helices bilden kann. Die erhaltenen Resultate wiesen darauf hin, dass die NP-Mutanten nur in Verbindung mit dem NPwt fähig waren, Helices zu bilden, diese dann aber im Vergleich zu Wildtyp-Helices teilweise eine irreguläre Konformation hatten. Dies unterstützt zum einen die Daten von Watanabe et al, laut derer die ersten 600 AS des NP zur Bildung von NP-Tubuli benötigt werden, die wahrscheinlich den hier beschriebenen NP-Helices entsprechen (Watanabe, Noda et al. 2006). Zum anderen unterstützt dieser Versuch die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse, die ergab, dass NP ohne intakte Coiled-Coil-Struktur keine *inclusions* bilden konnte. Die Fähigkeit zur Bildung von NP-Helices wird als Bedingung für die Morphogenese von Nukleokapsiden angesehen (Noda, Hagiwara et al. 2010).

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich bei der Coiled-Coil um eine prominente Selbstinteraktionsdomäne des NP handelt. Es ist aber weiterhin davon auszugehen, dass NP auch unabhängig von der Coiled-Coil-Domäne noch mit sich selbst interagieren kann, zum Beispiel Oligomere bilden kann. Die Entstehung der Helices jedoch ist ohne eine funktionelle Coiled-Coil-Struktur unmöglich. Auch von verwandten Viren ist bekannt, dass deren N-Proteine mehrere Oligomerisierungsdomänen haben, zum Beispiel weiß man vom verwandten RSV, dass die in der Helices benachbarten N-Proteine sowohl über den N-Terminus als auch den C-Terminus miteinander interagieren (Tawar R. 2010).

Es verschiedene Modelle zur Rolle der Coiled-Coil-Domäne beim *self assembly* des NP denkbar:

Zum einen wäre es möglich, dass es durch die Coiled-Coil im NP zu einer bestimmten Konformation kommt, aufgrund derer eine weitere Bindungsstelle im NP verfügbar wird. So konnte für das MARV gezeigt werden, dass hier der N- und C-Terminus miteinander interagieren (DiCarlo, Möller et al. 2007). Zum anderen könnte es aufgrund

einer durch die Coiled-Coil vermittelten Oligomerisierung zur Bildung einer weiteren Bindungsstelle für NP kommen. Dies ist allerdings nicht sehr wahrscheinlich, da NP auch ohne intakte Coiled-Coil im Complementation-Assay noch zur Selbstinteraktion fähig war, aber in der Elektronenmikroskopischen Analyse keine Helices mehr nachgewiesen werden konnten.

Bei dem Sin-Nombre-Virus, welches zu den Hantaviren (Familie Bunyaviridae) gehört und beim Menschen ein hämorrhagisches Fieber mit schwerem Lungenödem verursacht, wurden ebenfalls Coiled-Coil Domänen im NP-Protein entdeckt. Diese Domänen können sowohl intramolekulare helikale Bündel formen als auch intermolekulare Coiled-Coil-Trimere. Ebenfalls wird hier die Möglichkeit einer Konformationsänderung von intra- zu intermolekularen Coiled-Coil diskutiert. Ein solcher Konformationswechsel ist vom Hitzeschockfaktor 1 (hsf1) bekannt (Alfadhli, Steel et al. 2002).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Coiled-Coil bei der Bindung der RNA eine Rolle spielt. Coiled-Coils sind eigentlich keine klassischen RNA-Bindungsstrukturen, jedoch können sie die Oligomerisierung von Transkriptionsfaktoren oder eine bestimmte Konformation eines DNA-bindenden Moleküls vermitteln (Burkhard, Stetefeld et al. 2001), besonders häufig sind hier in Verbindung mit DNA-Bindung so genannte *leucine zipper* innerhalb des Proteins, bei denen in Position ‚a‘ und ‚d‘ häufig Leucine vorkommen. *Leucine zipper* kommen auch bei Oberflächenproteinen von Viren vor und man nimmt an, dass sie hier Homooligomerisierung vermitteln, zum Beispiel beim F-Protein der Paramyxoviren, dem S-Protein der Coronaviren und den env-Proteinen mancher Retroviren (Buckland, Malvoisin et al. 1992; Dubay, Roberts et al. 1992). Bekannt ist, dass Nukleoproteine der Mononegavirales und des Influenzavirus oft unspezifisch RNA binden können (Kingsbury, Jones et al. 1987; Masters und Banerjee 1988; Buchholz, Spehner et al. 1993).

Für EBOV konnte gezeigt werden, dass NP-Helices RNA-assoziiert sind und sich je nach Salzgehalt der Umgebung entwinden oder komprimieren können, eine Plastizität, die sie nach Abbau der RNA verlieren (Noda, Hagiwara et al. 2010).

Auch für das Sendai-Virus, ein Paramyxovirus, sowie das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV), ein Rhabdovirus, konnte gezeigt werden, dass RNA als integraler Bestandteil der Helices in diesen vor RNase geschützt vorliegt. Je nach Salzgehalt der Umgebung können sich die Helices ebenfalls entwinden oder dichter aufrollen (Heggeness, Scheid et al. 1980). Dieser Einschluss der RNA kann bei allen Mononegavirales beobachtet werden und ist für die Replikation oder Transkription wichtig (Muhlberger, Lotfering et

al. 1998). Weiterhin dient diese Verpackung dem Schutz der RNA vor den Komponenten des angeborenen Immunsystems (Albertini, Wernimont et al. 2006).

Insofern stellt sich die Frage, ob die Coiled-Coil-Region einen Einfluss auf die Fähigkeit des NP zur RNA-Bindung hat und ob diese bei der Bildung von NP-Helices eine Rolle spielt.

Die Coiled-Coil liegt ungefähr in der Mitte des EBOV-NP, und mit Bezug auf die bei den Mononegavirales konservierte zweigeteilte Struktur des NP könnte sie als eine Art Gelenk gesehen werden, durch welches die beiden Teile in die richtige Position zueinander gebracht werden. So ist zum Beispiel vom Influenzavirus (Familie *Orthomyxoviridae*) und Rabiesvirus (Familie *Rhabdoviridae*) bekannt, dass die beiden Teile der Nukleoproteine sich in einen „Kopf“ und einen „Körper“ gliedern, welche durch ein flexibles Gelenk (*hinge*) verbunden werden. Hierbei ist die hinge-Region allerdings keine Coiled-Coil, sondern es handelt sich insgesamt um ein helix-loop-helix-Motiv. In diesem findet auch die RNA-Interaktion statt (Albertini, Wernimont et al. 2006; Ye, Krug et al. 2006). Eine ähnliche Konformation wäre auch für EBOV denkbar. Obwohl Coiled-Coils keine klassischen RNA-Bindungsstrukturen sind ist eine Rolle der Coiled-Coil bei der RNA-Bindung nicht auszuschließen, da noch keine RNA-Bindende Domäne identifiziert wurde. Es könnte deshalb aufschlussreich sein, mittels eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) verschiedene NP-Deletionsmutanten und die Coiled-Coil-Domäne auf ihre RNA-Bindungskapazität zu untersuchen. Ebenso wäre es interessant, die Region AS 1-450 auf weitere NP-Interaktionsdomänen zu untersuchen, da, wie oben besprochen, die Coiled-Coil vermutlich nicht die einzige für das *self assembly* wichtige Domäne ist.

Das Coiled-Coil-Motiv scheint ausreichend für die Vermittlung einer NP-NP-Interaktion zu sein, ist allerdings wahrscheinlich nicht ausreichend, zur Ausbildung der hochkomplexen helikalen Struktur viraler Nukleokapside wozu es mehrerer Interaktionsdomänen bedarf .

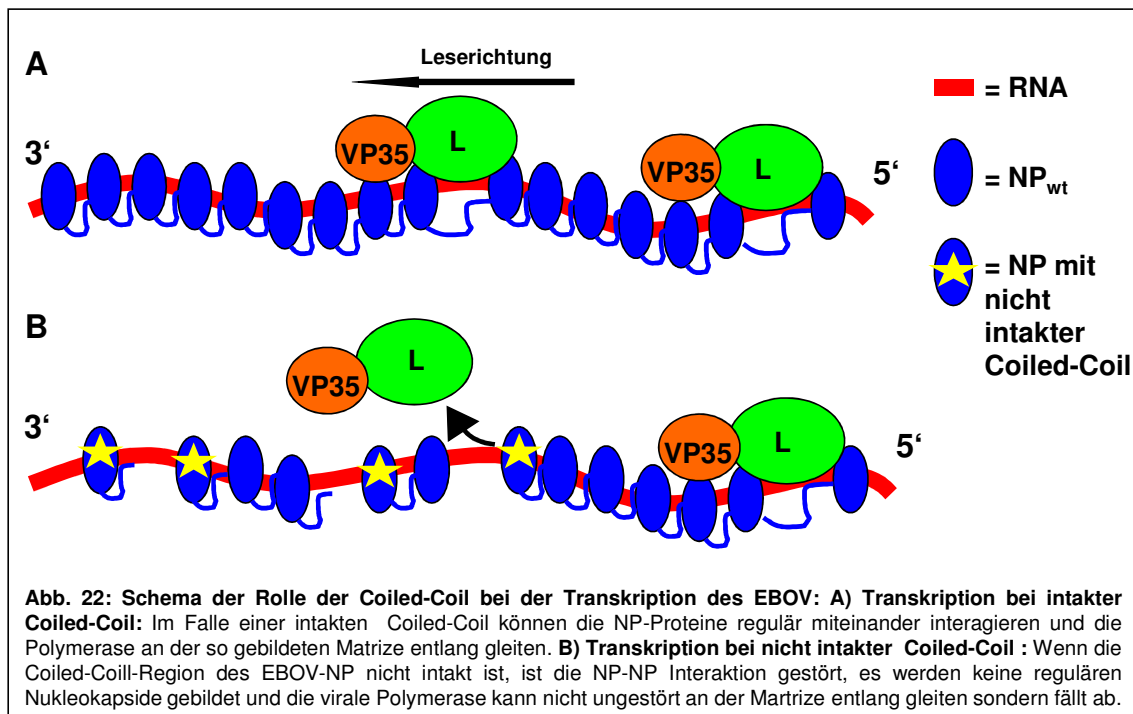
Einfluss der Coiled-Coil auf die virale Transkription

Der von NP, der viralen RNA und den Nukleokapsidproteinen VP30, VP35 und L gebildete Nukleokapsidkomplex dient als Matrize für die virale Transkription und Replikation. Ohne diese Verpackung der RNA gibt es keine Replikation oder Transkription (Muhlberger, Lotfering et al. 1998). Vom verwandten Rabies-Virus ist

bekannt, dass zur Bindung des Polymerase-Komplexes das Nukleokapsidprotein etwas von der RNA abdissoziieren, jedoch weiter in Kontakt bleiben muss, damit keine ds-RNA gebildet wird, welche das Virus nicht auflösen kann (Albertini, Wernimont et al. 2006). Die NP-RNA-Interaktion ist also essentiell für die virale Transkription.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass ein NP ohne intakte Coiled-Coil keine Transkription vermitteln kann. Die NP-Mutanten zeigen in Anwesenheit des Wildtyps einen dominant negativen Effekt, noch stärker wurde dieser Effekt bei deletierter Coiled-Coil. Es war überraschend, dass die NP-Mutanten durch ihre eigene Funktionslosigkeit auch einen negativen Effekt auf den Wildtyp haben. Dies könnte mit einer Behinderung der Bildung von NP-Helices erklärt werden, eine Fähigkeit, die als essentiell zur Bildung von Nukleokapsiden und damit Transkriptions-Matrizen angesehen wird. In P1, dass heißt unter Infektionsbedingungen, war der dominant negative Effekt der Mutanten noch stärker. Dies war zu erwarten, da hier zum einen nicht mehr die Proteine des Nukleokapsidkomplexes im Überfluss vorliegen, zum anderen kann nur noch in der P0 gebildetes Transkript umgesetzt werden.

Interessant ist, dass die Coiled-Coil überhaupt einen dominant negativen Effekt auf die Transkription hat. Wenn man bedenkt, dass die Enkapsidierung der viralen RNA für die Transkription essentiell ist, könnte man den beobachteten Effekt darauf zurück führen, dass das NP aufgrund einer durch eine nicht intakte Coiled-Coil-Region eine veränderten Konformation zeigt und nun nicht mehr so gut RNA binden kann. Dies könnte die Matrizenfunktion des Nukleokapsidkomplexes stören, sodass die Polymerase vom RNA-Strang abfällt und die Transkription abbricht, also ein dominant negativer Effekt aufgrund einer ineffektiven Transkription (siehe Abbildung 22).



Nach Beobachtung dieses dominant negativen Effekts stellte sich die Frage, ob die Coiled-Coil alleine auch einen dominant negativen Effekt auf die Transkription haben würde. Um dies zu testen, wurde der Effekt der Konstrukte aus dem Complementation Assay auf ihr Verhalten im iVLP-Assay getestet, da diese Konstrukte nur die Coiled-Coil und ein YFP-Fragment enthalten, von dem man keinen Effekt auf die Transkription annimmt. Leider trat hier ein cytotoxischer Effekt durch das YFP an sich auf, sodass der Versuch hinsichtlich des Einflusses der Coiled-Coil nicht auswertbar war. Vermutlich ließe sich dieser cytotoxische Effekt des YFP durch den Einsatz von weniger YFP-Plasmid-DNA abschwächen oder verhindern, da für den iVLP-Versuch insgesamt weniger DNA eingesetzt wird als zur Einzelexpression der Proteine. Möglich wäre auch, dass bei dem beobachteten Effekt Promotor-Wechselwirkungen eine Rolle spielen, da die YFP-Konstrukte in einem anderen Vektor vorlagen als die anderen für den iVLP-Assay verwendeten Plasmide. Ließe sich bei einer Anpassung der Versuchsbedingungen ein dominant negativer Effekt der Coiled-Coil auf die virale Transkription bestätigen, so wäre es interessant, die Coiled-Coil-Sequenz als Peptid zu synthetisieren und dieses ebenfalls im iVLP-Assay zu testen. Je nach Ausgang dieser Versuche könnte das Peptid dann auch dazu benutzt werden, die Transkription und damit die Viruslast im Tiermodell zu verringern. So ist bekannt, dass bei nicht-menschlichen Affen eine tödliche Infektion mit einer Viruslast von ca. 10^6 - 10^7 plaquebildende Einheiten einher geht, wohingegen eine Viruslast von 10^4

plaquebildenden Einheiten als Schwelle zum Überleben der Affen angesehen wird (Geisbert 2010). Beim Menschen wurden Maximalwerte von $4,3 \times 10^7$ Genomkopien bei Überlebenden und $3,4 \times 10^9$ Genomkopien bei Verstorbenen beobachtet (Towner, Rollin et al. 2004). Ein Peptid, welches einen dominant negativen Effekt auf die virale Transkription hat, könnte eine Strategie darstellen, die Viruslast unter diese Schwelle zu senken und so die Ausbreitung des Virus im Körper und damit Infektion zu kontrollieren.

Zusammenfassend konnte eine bedeutende Rolle der Coiled-Coil-Region für die Interaktion von NP mit VP30 festgestellt werden, während die NP-VP35 Interaktion weitestgehend unabhängig von der Coiled-Coil-Region zu sein scheint, was das Vorliegen zweier verschiedener Bindungsstellen für die beiden Proteine auf dem NP nahe legt.

Eine intakte Coiled-Coil scheint weiterhin für die Bildung von komplexeren Strukturen wie NP-Helices wichtig zu sein, die für die Templatefunktion der viralen RNA essentiell ist. Dies führt zu einem Verlust der Templatefunktion der NP-Mutation. Eine Interaktion zwischen NP-Proteinen kann aber auch ohne Coiled-Coil-Region stattfinden, was auf mehrere Selbstinteraktionsdomänen auf dem NP hindeutet.

6. Zusammenfassung

Das Ebolavirus (EBOV) bildet mit dem Marburgvirus die Familie der Filoviren, die aufgrund ihres einzelsträngigen, negativ orientierten RNA-Genoms der Ordnung der Mononegavirales zugeteilt werden. Filoviren verursachen beim Menschen und bei nicht-menschlichen Primaten ein schweres hämorrhagisches Fieber mit einer Mortalitätsrate bis zu 90%. Deshalb und weil es bisher keine spezifische Therapie und keine Impfung gibt, werden Filoviren als Pathogene der Sicherheitsstufe 4 eingestuft.

Der Nukleokapsidkomplex des EBOV besteht aus dem nicht-segmentierten RNA-Genom sowie dem Nukleokapsidprotein NP, der viralen Polymerase L, dem Polymerase-Ko-Faktor VP35 sowie VP30 besteht.

Gegenstand dieser Arbeit ist eine Coiled-Coil-Domäne innerhalb des NP, deren Einfluss auf verschiedene Funktionen des NP untersucht werden sollte. Hierfür wurde die Rolle der Coiled-Coil bei der Interaktion mit VP30 und VP35 analysiert. NP-Mutanten, die entweder keine Coiled-Coil-3D-Struktur oder gar keine Coiled-Coil mehr aufwiesen, konnten hier zwar noch mit VP35, aber nicht mehr mit VP30 interagieren. Die Gründe hierfür sind vermutlich, dass VP35 mehrere Bindungsstellen besitzt und VP30 entweder im Bereich der Coiled-Coil bindet oder die durch die Coiled-Coil vermittelte Konformation des NP benötigt.

Weiterhin befasst sich diese Arbeit mit der Rolle der Coiled-Coil-Domäne bei der NP-NP-Interaktion und dem *self assembly*. Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass die Bildung von NP-Einschlusskörpern, so genannter *inclusions*, von der Coiled-Coil-Domäne abhängt. Coiled-Coil-defiziente Mutanten können aber noch durch NPwt in *inclusions* rekrutiert werden, die Fähigkeit zur Selbstinteraktion ist also nur eingeschränkt. Mittels eines Complementation Assays konnte gezeigt werden, dass die Coiled-Coil-Domäne allein ausreichend für eine NP-NP Bindung sein kann. Immunelektronenmikroskopischen Analysen konnten zudem zeigen, dass die Bildung von NP-Helices, welche das Gerüst der Nukleokapside darstellen, ebenfalls nur bei intakter Coiled-Coil-Domäne oder in Gegenwart von NPwt möglich ist. Eine Rolle könnte hierbei entweder eine durch die Coiled-Coil-Domäne vermittelte Oligomerisierung des NP oder RNA-Interaktion spielen, welche zur Bildung von Helices wichtig ist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Einfluss Coiled-Coil-Domäne auf die virale Transkription untersucht. Hierbei zeigte sich im iVLP-Assay, dass eine nicht intakte Coiled-Coil einen dominant negativen Effekt auf die Transkription hat. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass ohne intakte Coiled-Coil keine NP-Helices gebildet werden können und so auch keine regulären Nukleokapside, welche für die Polymerase als Matrize zur Transkription und Replikation dienen.

Stichworte: EBOV, NP, Nukleokapsid, *self assembly*, Coiled-Coil

7. Summary

Ebola virus and Marburg virus make up the family *Filoviridae*. Due to their single-stranded RNA genome in negative orientation, they belong to the order *Mononegavirales*.

Filoviruses cause a severe hemorrhagic fever in humans and non-human primates with fatality rates up to 90%. Because of the severe illness, and the fact that there is no specific treatment or vaccination, they are classified as BSL-4 pathogen.

The Nucleocapsid is built by the non-segmented RNA-genome, the nucleoprotein NP, the viral polymerase L, the polymerase-cofactor VP35 and VP30.

Subject of this study is a coiled coil domain within NP and its influence on various functions of NP. First the role of the coiled coil domain in the interaction of NP with VP30 and VP35 was investigated by immunofluorescence analysis. NP-mutants without coiled coil 3D-structure or without coiled coil domain were still able to interact with VP35, but not with VP30. This could be due to two binding domains on NP for VP35. Binding of VP30 to NP is either mediated directly by the coiled coil or requires a 3D confirmation determined by the NP coiled coil.

Furthermore, this study is focussing on the influence of the coiled coil domain on NP-NP interaction and self assembly of NP. By immunofluorescence analysis it could be proofed that the formation of NP inclusion bodies (inclusions) depends on a functional coiled coil. Knock-out mutants could still be recruited to inclusions build by NPwt, suggesting that the loss of the coiled coil domain only causes a partly loss of the ability for self-interaction. With an complementation assay it could be shown that the coiled coil domain is sufficient to mediate NP-NP interactions. NP forms helices that are supposed to be the framework of the nucleocapsids. Analysis of NP-helices by electron microscopy suggested that the ability to form helices also depends on an intact coiled coil domain or the presence of NPwt. NP mutants alone were not able to assemble to helices. Oligomerization mediated by the coiled coil domain or an interaction with RNA influenced by this domain could be reasons for these findings.

The last part of the study is dedicated to the influence of the NP coiled coil domain on viral transcription. In an iVLP assay a dominant negative effect of NP with deleted or mutated coiled coil domain could be observed. This is probably due to a defect of NP with deleted or mutated coiled coil in encapsidation the virus sepecific minigenome that

serves as template for the viral polymerase complex which is also indicated by the altered NP helices formation.

Key words :

Ebola virus, NP, nucleocapsid, coiled coil domain, self assembly

8. Literaturverzeichnis

- Alazard-Dany, N., V. Volchkova, et al. (2006). "Ebola virus glycoprotein GP is not cytotoxic when expressed constitutively at a moderate level." *J Gen Virol* **87**(Pt 5): 1247-1257.
- Albertini, A., A. Wernimont, et al. (2006). "Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex." *Science* **313**(5785): 360-363.
- Aleksandrowicz, P., K. Wolf, et al. (2008). "Viral haemorrhagic fever and vascular alterations." *Hamostaseologie* **28**(1-2): 77-84.
- Alfadhli, A., E. Steel, et al. (2002). "Hantavirus nucleocapsid protein coiled-coil domains." *J Biol Chem* **277**(30): 27103-27108.
- Babst, M., D. Katzmann, et al. (2002). "Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting." *Dev Cell* **3**(2): 271-282.
- Babst, M., D. Katzmann, et al. (2002). "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body." *Dev Cell* **3**(2): 283-289.
- Baize, S., E. M. Leroy, et al. (1999). "Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients." *Nat Med* **5**(4): 423-426.
- Baize, S., P. Marianneau, et al. (2001). "Recent advances in vaccines against viral haemorrhagic fevers." *Curr Opin Infect Dis* **14**(5): 513-518.
- Bamberg, S., L. Kolesnikova, et al. (2005). "VP24 of Marburg virus influences the formation of infectious particles." *J Virol* **79**(21): 13421-13433.
- Bankamp, B., S. Horikami, et al. (1996). "Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly." *Virology* **216**(1): 272-277.
- Barrette, R., S. Metwally, et al. (2009). "Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus." *Science* **325**(5937): 204-206.
- Basler, C. F. and G. K. Amarasinghe (2009). "Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses." *J Interferon Cytokine Res* **29**(9): 511-520.
- Basler, C. F., A. Mikulasova, et al. (2003). "The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3." *J Virol* **77**(14): 7945-7956.
- Basler, C. F., X. Wang, et al. (2000). "The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12289-12294.
- Bavari, S., C. M. Bosio, et al. (2002). "Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses." *J Exp Med* **195**(5): 593-602.
- Becker, S., H. Feldmann, et al. (1992). "Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide?" *Med Microbiol Immunol (Berl)* **181**(1): 43-55.
- Becker, S., S. Huppertz, et al. (1994). "The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated." *J Gen Virol* **75** (Pt 4): 809-818.
- Becker, S. and E. Muhlberger (1999). "Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 23-34.
- Becker, S., C. Rinne, et al. (1998). "Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins." *Virology* **249**(2): 406-417.
- Becker, S., M. Spiess, et al. (1995). "The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus." *J Gen Virol* **76** (Pt 2): 393-399.
- Bharat, T. A., T. Noda, et al. (2012). "Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11): 4275-4280.
- Bharat, T. A., J. D. Riches, et al. (2011). "Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells." *PLoS Biol* **9**(11): e1001196.

- Biedenkopf, N. (2007). "Die Rolle der Phosphorylierung des Ebolavirus VP30 für die initiale virale Transkription und die Lokalisation der VP30-Interaktionsdomäne auf dem Nukleoprotein." Diplomarbeit.
- Bosio, C. M., M. J. Aman, et al. (2003). "Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation." J Infect Dis **188**(11): 1630-1638.
- Bosio, C. M., B. D. Moore, et al. (2004). "Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells." Virology **326**(2): 280-287.
- Bourhis, J., V. Receveur-Bréchet, et al. (2005). "The intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein interacts with the C-terminal domain of the phosphoprotein via two distinct sites and remains predominantly unfolded." Protein Sci **14**(8): 1975-1992.
- Bowen, E. T., G. Lloyd, et al. (1977). "Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent." Lancet **1**(8011): 571-573.
- Buchholz, C., D. Spehner, et al. (1993). "The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly." J Virol **67**(10): 5803-5812.
- Buckland, R., E. Malvoisin, et al. (1992). "A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion." J Gen Virol **73** (Pt 7): 1703-1707.
- Burkhard, P., J. Stetefeld, et al. (2001). "Coiled coils: a highly versatile protein folding motif." Trends Cell Biol **11**(2): 82-88.
- Bwaka, M. A., M. J. Bonnet, et al. (1999). "Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients." J Infect Dis **179** Suppl 1: S1-7.
- Cardenas, W. B., Y. M. Loo, et al. (2006). "Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling." J Virol **80**(11): 5168-5178.
- Cartee, T. and G. Wertz (2001). "Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection." J Virol **75**(24): 12188-12197.
- CDC (2006 (updated 2010)). Known Cases and Outbreaks of Ebola Hemorrhagic Fever, in Chronological Order.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/ebola/ebolatable.htm>
(abgerufen am 06.06.2011).
- CDC (2009 (updated 2010)). Known Cases and Outbreaks of Marburg Hemorrhagic Fever, in Chronological Order.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/marburg/marburgtable.htm>
(abgerufen am 06.06.2011).
- CDC, C. f. D. C. a. P. (2005). "Outbreak of Marburg virus hemorrhagic fever--Angola, October 1, 2004-March 29, 2005." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **54**(12): 308-309.
- Chandran, K., N. J. Sullivan, et al. (2005). "Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection." Science **308**(5728): 1643-1645.
- Collins, P., M. Hill, et al. (1995). "Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11563-11567.
- Curran, J., R. Boeck, et al. (1995). "Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils." Virology **214**(1): 139-149.

- Dessen, A., V. Volchkov, et al. (2000). "Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus." *Embo J* **19**(16): 4228-4236.
- DiCarlo, A. (2004). Charakterisierung von Oligomerisierungsdomänen des Marburg-Virus Nukleoprotein und deren funktionelle Bedeutung (Dissertation). Marburg, Philipps-Universität Marburg.
- DiCarlo, A., P. Möller, et al. (2007). "Nucleocapsid formation and RNA synthesis of Marburg virus is dependent on two coiled coil motifs in the nucleoprotein." *Virol J* **4**: 105.
- Dubay, J. W., S. J. Roberts, et al. (1992). "Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity." *J Virol* **66**(8): 4748-4756.
- Elliott, L. H., M. P. Kiley, et al. (1985). "Descriptive analysis of Ebola virus proteins." *Virology* **147**(1): 169-176.
- Empig, C. J. and M. A. Goldsmith (2002). "Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses." *J Virol* **76**(10): 5266-5270.
- Falzarano, D., O. Krokhin, et al. (2006). "Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of Ebola virus." *Chembiochem* **7**(10): 1605-1611.
- Feldmann, H., H. Bugany, et al. (1996). "Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages." *J Virol* **70**(4): 2208-2214.
- Feldmann, H., M. Czub, et al. (2002). "Emerging and re-emerging infectious diseases." *Med Microbiol Immunol* **191**(2): 63-74.
- Feldmann, H., T. Geisbert, et al. (2005). Filoviridae. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. C. M. Fauquet. San Diego, CA, Elsevier Academic Press: 645-653.
- Feldmann, H., S. M. Jones, et al. (2005). "Therapy and prophylaxis of Ebola virus infections." *Curr Opin Investig Drugs* **6**(8): 823-830.
- Feldmann, H. and M. Kiley (1999). "Classification, structure, and replication of filoviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 1-21.
- Feldmann, H. and M. P. Kiley (1999). "Classification, structure, and replication of filoviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 1-21.
- Feldmann, H., V. E. Volchkov, et al. (2001). "Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins." *J Gen Virol* **82**(Pt 12): 2839-2848.
- Feng, Z., M. Cervený, et al. (2007). "The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR." *J Virol* **81**(1): 182-192.
- Finke, S. and K. K. Conzelmann (2003). "Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly." *J Virol* **77**(22): 12074-12082.
- Finke, S., R. Mueller-Waldeck, et al. (2003). "Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication." *J Gen Virol* **84**(Pt 6): 1613-1621.
- Fisher-Hoch, S., G. Perez-Oronoz, et al. (1992). "Filovirus clearance in non-human primates." *Lancet* **340**(8817): 451-453.
- Fisher-Hoch, S. P., G. I. Perez-Oronoz, et al. (1992). "Filovirus clearance in non-human primates." *Lancet* **340**(8817): 451-453.
- Formenty, P., C. Boesch, et al. (1999). "Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire." *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S120-126.
- Formenty, P., C. Boesch, et al. (1999). "Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire." *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S120-126.
- Garbutt, M., R. Liebscher, et al. (2004). "Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses." *J Virol* **78**(10): 5458-5465.
- García, J., B. García-Barreno, et al. (1993). "Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress

- the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein." *Virology* **195**(1): 243-247.
- Geisbert, T. (2010). Post-exposure protection of nonhuman primates against a lethal ebola virus challenge by RNA interference., 5th International Symposium on Filoviruses.
- Geisbert, T. W., L. E. Hensley, et al. (2003). "Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys." *Lancet* **362**(9400): 1953-1958.
- Geisbert, T. W. and P. B. Jahrling (1995). "Differentiation of filoviruses by electron microscopy." *Virus Res* **39**(2-3): 129-150.
- Geisbert, T. W., H. A. Young, et al. (2003). "Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event." *J Infect Dis* **188**(11): 1618-1629.
- Georges, A. J., E. M. Leroy, et al. (1999). "Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues." *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S65-75.
- Gomis-Ruth, F. X., A. Dessen, et al. (2003). "The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties." *Structure* **11**(4): 423-433.
- Grolla, A., A. Lucht, et al. (2005). "Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever." *Bull Soc Pathol Exot* **98**(3): 205-209.
- Groseth, A., J. E. Charton, et al. (2009). "The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified." *Virus Res* **140**(1-2): 8-14.
- Groseth, A., H. Feldmann, et al. (2007). "The ecology of Ebola virus." *Trends Microbiol* **15**(9): 408-416.
- Hartlieb, B., T. Muziol, et al. (2007). "Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2): 624-629.
- Hartlieb, B. and W. Weissenhorn (2006). "Filovirus assembly and budding." *Virology* **344**(1): 64-70.
- Hartman, A. L., J. S. Towner, et al. (2004). "A C-terminal basic amino acid motif of Zaire ebolavirus VP35 is essential for type I interferon antagonism and displays high identity with the RNA-binding domain of another interferon antagonist, the NS1 protein of influenza A virus." *Virology* **328**(2): 177-184.
- Harty, R. and P. Palese (1995). "Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH2- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself." *J Gen Virol* **76** (Pt 11): 2863-2867.
- Harty, R. N., M. E. Brown, et al. (2000). "A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13871-13876.
- Heggeness, M. H., A. Scheid, et al. (1980). "Conformation of the helical nucleocapsids of paramyxoviruses and vesicular stomatitis virus: reversible coiling and uncoiling induced by changes in salt concentration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(5): 2631-2635.
- Hensley, L., E. Stevens, et al. (2007). "Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever." *J Infect Dis* **196** Suppl 2: S390-399.
- Hoenen, T. (2006). "Function of the viral matrix proteins VP40 and VP24 for the life cycle of Ebolavirus." *Dissertation*.
- Hoenen, T., A. Groseth, et al. (2006). "Infection of naive target cells with virus-like particles - Implications for the function of Ebola virus VP24." *J Virol* **80**(14): 7260-7264.
- Hoenen, T., S. Jung, et al. (2010). "Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription." *Virology* **403**: 56-66.

- Hoenen, T., V. Volchkov, et al. (2005). "VP40 octamers are essential for Ebola virus replication." *J Virol* **79**(3): 1898-1905.
- Huang, Y., L. Xu, et al. (2002). "The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein." *Mol Cell* **10**(2): 307-316.
- Hughes, J., D. Mann, et al. (1986). "Viral isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections." *J Clin Microbiol* **24**(3): 487-489.
- Ito, H., S. Watanabe, et al. (1999). "Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein." *J Virol* **73**(10): 8907-8912.
- Ito, H., S. Watanabe, et al. (2001). "Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies." *J Virol* **75**(3): 1576-1580.
- Jaax, N., P. Jahrling, et al. (1995). "Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory." *Lancet* **346**(8991-8992): 1669-1671.
- Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, et al. (1990). "Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA." *Lancet* **335**(8688): 502-505.
- Johnson, B. K., D. Ocheng, et al. (1983). "Viral haemorrhagic fever surveillance in Kenya, 1980-1981." *Trop Geogr Med* **35**(1): 43-47.
- Johnson, E., N. Jaax, et al. (1995). "Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus." *Int J Exp Pathol* **76**(4): 227-236.
- Johnson, E. D., B. K. Johnson, et al. (1996). "Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya." *Arch Virol Suppl* **11**: 101-114.
- Johnson, K. M., J. V. Lange, et al. (1977). "Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire." *Lancet* **1**(8011): 569-571.
- Johnson, R. F., S. E. McCarthy, et al. (2006). "Ebola virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA into virus-like particles." *J Virol* **80**(11): 5135-5144.
- Jones, S. M., H. Feldmann, et al. (2005). Live recombinant vesicular stomatitis virus vectors protect mice, guinea pigs and nonhuman primates from challenge with Zaire Ebola virus and Marburg virus. *Abstracts of the XIII International Congress of Virology*, American Society for Microbiology, Washington, DC: 82.
- Jones, S. M., H. Feldmann, et al. (2005). "Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses." *Nat Med* **11**(7): 786-790.
- Kiley, M. P., E. T. Bowen, et al. (1982). "Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses?" *Intervirology* **18**(1-2): 24-32.
- Kiley, M. P., N. J. Cox, et al. (1988). "Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus." *J Gen Virol* **69** (Pt 8): 1957-1967.
- Kingsbury, D. W., I. M. Jones, et al. (1987). "Assembly of influenza ribonucleoprotein in vitro using recombinant nucleoprotein." *Virology* **156**(2): 396-403.
- Kolakofsky, D., P. Le Mercier, et al. (2004). "Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis." *Virology* **318**(2): 463-473.
- Kolesnikova, L., S. Bamberg, et al. (2004). "The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway." *J Virol* **78**(5): 2382-2393.
- Kolesnikova, L. and S. Becker (2004). "Virus Maturation." In H. D. Klenk, H. Feldmann (ed.), *Ebola and Marburg viruses*. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.: 171-201.
- Kunz, C., H. Hofmann, et al. (1968). "[Propagation of "Marburg virus" (Vervet monkey disease agent) in *Aedes aegypti*]." *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **208**(1): 347-349.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

- Le Guenno, B., P. Formenty, et al. (1995). "Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus." Lancet **345**(8960): 1271-1274.
- Leroy, E., A. Epelboin, et al. (2009). "Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007." Vector Borne Zoonotic Dis **9**(6): 723-728.
- Leroy, E., B. Kumulungui, et al. (2005). "Fruit bats as reservoirs of Ebola virus." Nature **438**(7068): 575-576.
- Leroy, E., P. Rouquet, et al. (2004). "Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife." Science **303**(5656): 387-390.
- Leroy, E. M., S. Baize, et al. (2001). "Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections." Clin Exp Immunol **124**(3): 453-460.
- Leroy, E. M., S. Baize, et al. (2000). "Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response." Lancet **355**(9222): 2210-2215.
- Licata, J. M., R. F. Johnson, et al. (2004). "Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles." J Virol **78**(14): 7344-7351.
- Licata, J. M., M. Simpson-Holley, et al. (2003). "Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4." J Virol **77**(3): 1812-1819.
- Lin, G., G. Simmons, et al. (2003). "Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR." J Virol **77**(2): 1337-1346.
- Longhi, S., V. Receveur-Bréchet, et al. (2003). "The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein." J Biol Chem **278**(20): 18638-18648.
- Lopez, L., S. Yang, et al. (2010). "Ebola glycoprotein counteracts BST-2/tetherin restriction in a sequence independent manner that does not require tetherin surface removal." J Virol.
- Lotfering, B., E. Muhlberger, et al. (1999). "The nucleoprotein of Marburg virus is target for multiple cellular kinases." Virology **255**(1): 50-62.
- Mahanty, S. and M. Bray (2004). "Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers." Lancet Infect Dis **4**(8): 487-498.
- Mahanty, S., K. Hutchinson, et al. (2003). "Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses." J Immunol **170**(6): 2797-2801.
- Manicassamy, B., J. Wang, et al. (2005). "Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry." J Virol **79**(8): 4793-4805.
- Mar'iankova, R. F., S. E. Glushakova, et al. (1993). "[The penetration of the Marburg virus into eukaryotic cells]." Vopr Virusol **38**(2): 74-76.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, et al. (2001). "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress." Nat Med **7**(12): 1313-1319.
- Martinez, M. J., N. Biedenkopf, et al. (2008). "Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation." J Virol **82**(24): 12569-12573.
- Martinez, O., C. Valmas, et al. (2007). "Ebola virus-like particle-induced activation of NF-kappaB and Erk signaling in human dendritic cells requires the glycoprotein mucin domain." Virology **364**(2): 342-354.
- Martini, G., H. Knauff, et al. (1968). "A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg-virus" disease." Ger Med Mon **13**(10): 457-470.
- Marzi, A., T. Gramberg, et al. (2004). "DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus." J Virol **78**(21): 12090-12095.

- Marzi, A., P. Möller, et al. (2007). "Analysis of the interaction of Ebola virus glycoprotein with DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) and its homologue DC-SIGNR." *J Infect Dis* **196 Suppl 2**: S237-246.
- Masters, P. S. and A. K. Banerjee (1988). "Complex formation with vesicular stomatitis virus phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to nonspecific RNA." *J Virol* **62**(8): 2658-2664.
- Mittler, E. (2009). Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatischen Domäne des Marburgvirus Oberflächenproteins GP.
- Modrof, J., S. Becker, et al. (2003). "Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein." *J Virol* **77**(5): 3334-3338.
- Modrof, J., E. Muhlberger, et al. (2002). "Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription." *J Biol Chem* **277**(36): 33099-33104.
- Moller, P., N. Pariente, et al. (2005). "Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription." *J Virol* **79**(23): 14876-14886.
- Monath, T. P. (1999). "Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research." *J Infect Dis* **179 Suppl 1**: S127-138.
- Monson, M. H., A. K. Cole, et al. (1987). "Pediatric Lassa fever: a review of 33 Liberian cases." *Am J Trop Med Hyg* **36**(2): 408-415.
- Muhlberger, E. (2004). Genome Organization, Replication, and Transcription of Filoviruses. *Ebola and Marburg viruses*. H. D. Klenk and H. Feldmann. Norfolk, U.K., Horizon Bioscience: 1-26.
- Muhlberger, E., B. Lotfering, et al. (1998). "Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes." *J Virol* **72**(11): 8756-8764.
- Muhlberger, E., A. Sanchez, et al. (1992). "The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses." *Virology* **187**(2): 534-547.
- Muhlberger, E., S. Trommer, et al. (1996). "Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure." *Virology* **223**(2): 376-380.
- Muhlberger, E., M. Weik, et al. (1999). "Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems." *J Virol* **73**(3): 2333-2342.
- Murphy, F. A., G. van der Groen, S. G. Whitfield, and J. V. Lange** (1978). Ebola and Marburg-Virus morphology and taxonomy. Ebola virus hemorrhagic fever, Pattny, S. R. (ed.). **1st edn.**: 61-84.
- Myers, T., A. Pieters, et al. (1997). "A highly conserved region of the Sendai virus nucleocapsid protein contributes to the NP-NP binding domain." *Virology* **229**(2): 322-335.
- Negredo, A., G. Palacios, et al. (2011). "Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002304.
- Nguyen, T. L., G. Schoehn, et al. (2005). "An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: Structural insights into the monomer-hexamer transition." *J Struct Biol*.
- Nichol, S., J. Arikawa, et al. (2000). "Emerging viral diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12411-12412.
- Nishio, M., M. Tsurudome, et al. (1999). "Mapping of domains on the human parainfluenza virus type 2 nucleocapsid protein (NP) required for NP-phosphoprotein or NP-NP interaction." *J Gen Virol* **80 (Pt 8)**: 2017-2022.
- Noda, T., K. Hagiwara, et al. (2010). "Characterization of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex." *J Gen Virol* **91**(Pt 6): 1478-1483.

- Noda, T., H. Sagara, et al. (2002). "Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP." *J Virol* **76**(10): 4855-4865.
- Noda, T., S. Watanabe, et al. (2007). "Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus." *J Virol* **81**(7): 3554-3562.
- Pattyn, S., G. van der Groen, et al. (1977). "Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire." *Lancet* **1**(8011): 573-574.
- Peters, C. J., M. J. Buchmeier, et al. (1996). Arenaviruses. *Fields Virology*. B. Fields, D. Knipe and P. Hoewley. Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins. **1**: 1521-1545.
- Peters, C. J. and J. W. LeDuc (1999). "An introduction to Ebola: the virus and the disease." *J Infect Dis* **179** Suppl 1: ix-xvi.
- Poch, O., B. M. Blumberg, et al. (1990). "Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains." *J Gen Virol* **71** (Pt 5): 1153-1162.
- Reid, S. P., W. B. Cardenas, et al. (2005). "Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein." *Virology* **341**(2): 179-189.
- Reid, S. P., L. W. Leung, et al. (2006). "Ebola Virus VP24 Binds Karyopherin alpha 1 and Blocks STAT1 Nuclear Accumulation." *J Virol* **80**(11): 5156-5167.
- Ruigrok, R. W., G. Schoehn, et al. (2000). "Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus." *J Mol Biol* **300**(1): 103-112.
- Ruthel, G., G. L. Demmin, et al. (2005). "Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules." *J Virol* **79**(8): 4709-4719.
- Ryabchikova, E. I., L. V. Kolesnikova, et al. (1999). "Animal pathology of filoviral infections." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 145-173.
- Sanchez, A., M. Kiley, et al. (1992). "Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses." *J Gen Virol* **73** (Pt 2): 347-357.
- Sanchez, A., M. P. Kiley, et al. (1989). "The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression." *Virology* **170**(1): 81-91.
- Sanchez, A., M. Lukwiya, et al. (2004). "Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels." *J Virol* **78**(19): 10370-10377.
- Sanchez, A., S. G. Trappier, et al. (1996). "The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3602-3607.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." *J Mol Biol* **94**(3): 441-448.
- Schnittler, H. J. and H. Feldmann (1999). "Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 175-204.
- Schorner, K., S. Matsuyama, et al. (2006). "Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein." *J Virol* **80**(8): 4174-4178.
- Scianimanico, S., G. Schoehn, et al. (2000). "Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein." *Embo J* **19**(24): 6732-6741.
- Shi, W., Y. Huang, et al. (2008). "A Filovirus-unique Region of Ebola Virus Nucleoprotein Confers Aberrant Migration and Mediates Its Incorporation into Virions." *J Virol*.
- Siebert, R., H. Shu, et al. (1968). "Isolation and identification of the "Marbury virus"." *Ger Med Mon* **13**(11): 514-518.
- Simmons, G., J. D. Reeves, et al. (2003). "DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells." *Virology* **305**(1): 115-123.
- Simpson, D. I. (1977). "Marburg fever." *Nurs Mirror* **144**(21): 13-15.
- Slenczka, W. (1999). "The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes." *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 49-75.

- Slenzcka, W., Rietschel, M., Hoffmann, C. and Sixl W. (1984). "Seroepidemiologische Untersuchung über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola Virus in Afrika." Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasit **6**: 53-60.
- Stroher, U. and H. Feldmann (2006). "Progress towards the treatment of Ebola haemorrhagic fever." Expert Opin. Investig. Drugs **15**(12): 1523-1535.
- Stroher, U., E. West, et al. (2001). "Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses." J Virol **75**(22): 11025-11033.
- Sullivan, N. J., A. Sanchez, et al. (2000). "Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates." Nature **408**(6812): 605-609.
- Swenson, D. L., K. L. Warfield, et al. (2005). "Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections." Vaccine **23**(23): 3033-3042.
- Takada, A. and Y. Kawaoka (2001). "The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever." Trends Microbiol **9**(10): 506-511.
- Takada, A., S. Watanabe, et al. (2001). "Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein." J Virol **75**(5): 2324-2330.
- Tawar R., D. S., Vonnrhein C., Varela P.F., Damier-Piolle L., Castagné N., MacLellan K., Bricogne G., Bhella D., Eléouet J.-F. and Rey F.A. (2010). X-Ray Structure of a Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein-RNA-Template-Like Assembly. Brugge, Belgium, XIV. International Conference on Negative Stranded Viruses.
- Timmins, J., G. Schoehn, et al. (2003). "Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40." Virology **312**(2): 359-368.
- Timmins, J., G. Schoehn, et al. (2003). "Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4." J Mol Biol **326**(2): 493-502.
- Towner, J. S., P. E. Rollin, et al. (2004). "Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome." J Virol **78**(8): 4330-4341.
- Towner, J. S., T. K. Sealy, et al. (2008). "Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda." PLoS Pathog **4**(11): e1000212.
- Tuffs, A. (2009). "Experimental vaccine may have saved Hamburg scientist from Ebola fever." BMJ **338**: b1223.
- Volchkov, V. E., S. Becker, et al. (1995). "GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases." Virology **214**(2): 421-430.
- Volchkov, V. E., A. A. Chepurinov, et al. (2000). "Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus." Virology **277**(1): 147-155.
- Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, et al. (1998). "Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection." Virology **245**(1): 110-119.
- Wang, D., N. U. Raja, et al. (2006). "Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus." J Virol **80**(6): 2738-2746.
- Warfield, K. L., C. M. Bosio, et al. (2003). "Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15889-15894.
- Watanabe, S., T. Noda, et al. (2006). "Functional mapping of the nucleoprotein of ebola virus." J Virol **80**(8): 3743-3751.
- Weik, M., J. Modrof, et al. (2002). "Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation." J Virol **76**(17): 8532-8539.
- Weissenhorn, W., A. Carfi, et al. (1998). "Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain." Mol Cell **2**(5): 605-616.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1999). "Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses." Mol Membr Biol **16**(1): 3-9.

- WHO (1978). "Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team." Bull World Health Organ **56**(2): 247-270.
- WHO (2007). "Outbreak of Marburg haemorrhagic fever: Uganda, June-August 2007." Wkly Epidemiol Rec **82**(43): 381-384.
- WHO (2008). "Case of Marburg Haemorrhagic Fever imported into the Netherlands from Uganda."
- WHO (abgerufen am 06.06.2011). Ebola in Uganda. http://www.who.int/csr/don/2011_05_18/en/index.html.
- Will, C., E. Muhlberger, et al. (1993). "Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein." J Virol **67**(3): 1203-1210.
- Wool-Lewis, R. J. and P. Bates (1998). "Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines." J Virol **72**(4): 3155-3160.
- Yang, Z. Y., H. J. Duckers, et al. (2000). "Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury." Nat Med **6**(8): 886-889.
- Ye, Q., R. Krug, et al. (2006). "The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA." Nature **444**(7122): 1078-1082.
- Zaki, S. R., Peters, C.J. (1997). "Viral Haemorrhagic Fever." Diagnostic Pathology of Infectious Diseases **Appleton and Lange, Stanford, USA**: 347-364.

9. Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

3D	3-dimensional
α	Anti
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BEBOV	Bundibogyo-Ebolavirus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL-4	Biologisches Sicherheitslevel 4
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (USA)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
CIEBOV	Ivory Coast Ebolavirus
C-Terminus	Carboxyterminus
d (bei dH ₂ O)	Deionisiert
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin</i>
DC-SIGNR	<i>dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin related protein</i>
ddNTP	2'3' –Didesoxynukleosidtriphosphat
DIC	disseminated intravascular coagulation, Verbrauchskoagulopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2' –Desoxynukleosidtriphosphat
DRC	Demokratische Republik Kongo
ds	Doppelsträngig
E.coli	Escherichia Coli

EBOV	Ebolavirus
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1
GP	Glycoprotein
h	Stunden
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HUH	humane Hepatomazellen
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IRF	Interferon regulierender Faktor
iVLP (-Assay)	infectious virus-like particle –Assay
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
L (-Protein)	<i>Large-Protein</i> (Polymerase L)
LB (-Medium)	<i>lysogeny broth</i>
MAP(-Kinase)	<i>mitogen-activated protein-Kinase</i>
MARV	Marburgvirus
mem	<i>Minimal Essential Medium</i>
min	Minuten
MPS	monozytäres phagozytisches System
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multi vesicular bodies</i> = multivesikuläre Strukturen
Nedd4	<i>neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κ B</i>

NP	Nukleoprotein
NPccmut	Mutante des Nukleoproteins mit mutierter coiled coil
NP Δ cc	Mutante des Nukleoproteins mit deletierter coiled coil
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> = offener Leserahmen
p.t.	<i>post transfection</i> = nach der Transfektion
P/S	PenStrep
P0	Passage 0
P1	Passage 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
REBOV	Reston Ebolavirus
rhAPC	<i>recombinant human activated protein</i> = rekombinantes menschliches aktiviertes Protein C
RNA	Ribonukleinsäure
rNAPc2	<i>recombinant nematode anticoagulant protein c2</i> = rekombinanter Inhibitor des Gewebefaktors VIIa
RNP-Komplex	Ribonukleoproteinkomplex
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SEBOV	Sudan Ebolavirus
sec	Sekunden
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab	Tabelle
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>

U	Einheiten
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen per Minute
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VHF	virales hämorrhagisches Fieber
VLP	<i>virus-like particles</i> = Virus-ähnliche Partikel
VP	Virusprotein
vRNA	virale RNA
VSV	<i>vesikular stomatitis virus</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT/wt	Wildtyp
λ	Lambda = Wellenlänge

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1	Taxonomie der Filoviren	8
Abbildung 2	(A) Elektronenmikroskopische Darstellung eines ZEBOV-Partikels (B) Schematische Darstellung eines ZEBOV-Partikels	16
Abbildung 3	Genomstruktur des ZEBOV	17
Abbildung 4	Vorhersage für eine Coiled-Coil-3D-Struktur für MARV NP und EBOV NP mit COILS	19
Abbildung 5	Schema des iVLP-Systems	28
Abbildung 6	Schema einer PCR	43
Abbildung 7	Prinzip des Fluorescence Complementation Assays	63
Abbildung 8	NP _{wt} und Mutanten	66
Abbildung 9	Untersuchung des Abbaus der Coiled-Coil-Mutanten	67
Abbildung 10	Interaktion zwischen NP _{wt} und den NP-Mutanten	68
Abbildung 11	Interaktion zwischen NP _{wt} bzw. Mutanten und VP30	70
Abbildung 12	Interaktion zwischen NP _{wt} bzw. Mutanten und VP35	71
Abbildung 13	YFP-Konstrukte für den Complementation Assay	74
Abbildung 14	Einzelexpression der YFP-Konstrukte	75
Abbildung 15	Interaktion zwischen YFP-Fragmenten mit unterschiedlich orientierten Coiled-Coil-Domänen	76
Abbildung 16	Interaktion der Coiled-Coil-verbundenen YFP-Konstrukte im Complementation Assay	77
Abbildung 17	Analyse der NP-Helices	79
Abbildung 18	Vergleich der Reportergenaktivität von NP _{wt} und Mutanten	81
Abbildung 19	Vergleich der Reportergenaktivität der YFP-Konstrukte in P0	83
Abbildung 20	Proteinase K Verdau von NP _{wt} und Mutanten	84
Abbildung 21	Vergleich der Reportergenaktivität von NP _{wt} und Mutanten in P1	85
Abbildung 22	Schema der Rolle der Coiled-Coil bei der Transkription des EBOV	96
Tabellen	Titel	Seite
Tabelle 1	Ausbrüche von Filovirus-Infektionen	10

11. Curriculum Vitae

Die Seite 117 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

12. Liste der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Aachen waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten:

Autschbach	Marx
Bernhagen	Merk
Beyer	Neuschaefer-
Büll	Rube
Dott	Niethard
Eble	Noth
Fahlke	Osieka
Flöge	Paar
Gauggel	Pallua
Gilsbach	Prescher
Gressner	Radbruch
Greven	Rath
Groß	Rink
Häusler	Ritter
Heidenreich	Rossaint
Heinrich	Schiwy-Bochat
Herpertz-	Schmalzing
Dahlmann	Schneider
Hilgers	Schumpelick
Jacobs	Seghaye
Karges	Spitzer
Kaufmann	Thron
Klemradt	Trautwein
Knüchel-Clarke	Ulig
Korr	Vázquez-Jiménez
Kraus	Walter
Krüger	Wein
Kuth	Weis
Lückhoff	Westhofen
Lüscher	Zerres
Lüttiken	

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Funktion der Coiled-Coil-Domäne im Nukleoprotein des Ebolavirus“ im Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. Stephan Becker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Becker für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Virologie zu machen sowie für das Vertrauen, welches ich trotz meines fachfremden Hintergrunds genossen habe.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Becker danken, die mir nicht nur mit Rat und Tat zur Seite standen sondern mich auch moralisch unterstützt haben. Vielen Dank Dirk Becker, Anne Brüggemann, Olga Dolnik, Allison Groseth, Astrid Herwig, Thomas Hoenen, Katharina Kowalski, Verena Krähling, Gordian Schudt, Hosam Shams-Eldin und Svenja Wolff.

Ganz besonderer Dank geht an Nadine Biedenkopf für ihre Einarbeitung und Anleitung, außerdem an Nadine Biedenkopf und an Eva Mittler für die gute Gemeinschaft in „unserem“ Labor. Besonderer Dank weiterhin an Larissa Kolesnikova für die Kooperation für die elektronenmikroskopischen Analysen.

Zusätzlich geht mein Dank an die Studienstiftung des deutschen Volkes, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.